

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Direkter adenoviraler Gentransfer von Bone morphogenetic protein-2 und
Indian Hedgehog zur Knorpelregeneration im Kaninchenmodell**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Jakob Tobias Sieker
aus Idstein

Würzburg, März 2015

Referent: Prof. Dr. med. Andre Steinert
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jochen Bodem
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2016

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

95% CI	95% Konfidenzintervall
AAV	Adenovirus-assoziiertes Vektor
AAVs	Adenovirus-assoziierte Vektoren
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
ACT-C	Kollagen-bedeckte Autologe Chondrozyten Transplantation
ACT-P	Periost-bedeckte Autologe Chondrozyten Transplantation
ALK-2	Activin-like Kinase 2
AMIC	Autologe Membran-induzierte Chondrogenese
AORC	Arthritis und andere rheumatische Erkrankungen (engl. Arthritis and other rheumatic conditions)
BMPR-I	Bone morphogenetic protein Rezeptor Typ I
BMPR-II	Bone morphogenetic protein Rezeptor Typ II
BMPRIA	Bone morphogenetic protein Rezeptor IA
BMPRIB	Bone morphogenetic protein Rezeptor IB
BMPs	Knochenmorphogenetische Proteine (engl. Bone morphogenetic proteins)
BMP-1	Bone morphogenetic protein 1
<i>BMP2</i>	Offizielles Symbol des Gens, welches Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) kodiert
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BMP-2 ⁺	Bezeichnung der BMP-2 exponierten Therapiegruppe im Rahmen der Meta-Analyse des Risikos zur Osteophytenformation nach BMP-2 Behandlung

Abkürzungsverzeichnis

BMP-2 ⁻	Bezeichnung der nicht-BMP-2 exponierten Kontrollgruppe im Rahmen der Meta-Analyse des Risikos zur Osteophytenformation
BMP-3	Bone morphogenetic protein 3
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
BMP-5	Bone morphogenetic protein 5
BMP-6	Bone morphogenetic protein 6
BMP-7	Bone morphogenetic protein 7
BMSCs	Knochenmark-Stromazellen (engl. Bone marrow stromal cells)
BSA	Bovines Serumalbumin
CCI	Charakterisierte Chondrocyten Implantation
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CG-Matrix	Typ II Kollagen-Chondroitin-4-sulfate Matrix
CI	Konfidenzintervall
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CS-4	Chondroitin-4-Sulfat
CS-6	Chondroitin-6-Sulfat
DHH	Desert hedgehog
EZM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor
FACITs	Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Triplehelices (engl. Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices)

Abkürzungsverzeichnis

FGFs	Fibroblast growth factors
GAG	Glykosaminoglykan
GAGs	Glykosaminoglykane
GDFs	Growth/differentiation factors
<i>GFP</i>	Offizielles Symbol des Gens, welches Grün-fluoreszierendes Protein kodiert
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HA	Haluronsäure (engl. Hyaluronic acid)
HCl	Salzsäure (engl. Hydrochloric acid)
HE	Hämatoxylin Eosin
HMG-box	High Mobility Group-box
HSV-1	Herpes simplex Virus-1
ICRS II	ICRS II Histological Scoring System
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
<i>IHH</i>	Offizielles Symbol des Gens, welches Indian hedgehog protein (IHH) kodiert
IHH	Indian hedgehog protein
IKDC	International Knee Documentation Committee
IKDC-Score	International Knee Documentation Committee-Score
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung der Universität Würzburg

Abkürzungsverzeichnis

Label	Streptavidin gekoppelte Alkalische Phosphatase aus dem SuperSensitive TM Link-label IHC Detection System (BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA)
Link	Biotinylierter Antikörper gegen Maus-IgG und Maus-IgM aus dem SuperSensitive TM Link-label IHC Detection System (BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA)
MACI	Matrix-assoziierte Chondrozyten Implantation
MACI®	Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation (Genzyme Europe BV, Naarden, The Netherlands)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCP	Metacarpophalangealgelenke
MIA	Melanoma inhibitory activity
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
N-Cadherin	Neurales Cadherin
NCAM	Neurale Zelladhäsionsmoleküle
NLME	Linear and Nonlinear Mixed Effects Models Paket der Software R (Version 3.1.0, http://cran.r-project.org)
NZWRs	New Zealand White Rabbits
OA	Arthrose (engl. osteoarthritis)
OATS®	Osteochondral Autograft Transfer System® (Arthrex Inc., Naples, USA)
OCD	Osteochondrosis dissecans

Abkürzungsverzeichnis

OZMF	Orthopädisches Zentrum für Muskuloskelettale Forschung der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus
p38 MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
Ptc-1	Patched-1 Rezeptor
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Proteoglykan
PGA	Polyglykolsäure (engl. Polyglycolic acid)
PGs	Proteoglykane
PLA	Poly lactide (engl. Polylactic acid)
PLGA	Poly lactid-Polyglykolsäure (engl. Polylactic-co-glycolic acid)
PLM	Polarisierte Lichtmikroskopie
<i>PTH LH</i>	Offizielles Symbol des Gens, welches Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) kodiert
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
PT-OA	Posttraumatische Arthrose (engl. Posttraumatic osteoarthritis)
PT-TKA	Posttraumatische Knie Totalendoprothese (engl. Posttraumatic total knee arthroplasty)
RD	Absolute Risikoreduktion (engl. Risk difference)
SD	Standardabweichung (engl. Standard deviation)
SHH	Sonic hedgehog
siRNA	Small interfering RNA

Abkürzungsverzeichnis

SMA	Protein, welches durch das Gen <i>Sma</i> codiert wird (<i>Sma</i> für small body size)
SMAD	Proteinfamilie mit Funktion im intrazellulären Signaling und Regulation der Transkription; Kofferwort aus „mother against decapentaplegic [MAD]“ und „SMA“
Smo	Smoothened
Sox	Sry-related HMG-box transcription factors
Sox6	Sry-related HMG-box transcription factor 6
Sox9	Sry-related HMG-box transcription factor 9
Sry	Sex determining region of Y
T3	Triiodthyronin
TGF- β	Transforming growth factor- β
USD	U.S. Dollar
VAS	Visuelle Analog Skala
Wiley Database	Journal of Gene Medicine Clinical Trial Database

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidemiologie der Gelenkknorpelläsion	1
1.2. Anatomie des Gelenkknorpels	4
1.2.1. Morphologie des Gelenkknorpels	4
1.2.2. Biochemie des Gelenkknorpels	5
1.2.3. Biomechanik des Gelenkknorpels	9
1.2.4. Zytologie des Gelenkknorpels	9
1.2.5. Entwicklung des Gelenkknorpels	10
1.3. Pathologie des Gelenkknorpels	11
1.3.1. Ätiologie, Pathomechanismus und Heilungskapazität	11
1.3.2. Defektgröße und Defektgrad	13
1.4. Klinische Therapieverfahren der Gelenkknorpelläsion	15
1.4.1. Übersicht über die verfügbaren Therapieverfahren	15
1.4.2. Limitationen zellbasierter Verfahren	19
1.5. Gentherapie der Gelenkknorpelläsion	20
1.5.1. Gene zur Förderung der chondrogenen Differenzierung	21
1.5.2. BMPs und BMP-2.	21
1.5.3. Inhibition der hypertrophen Differenzierung	24
1.5.4. IHH und PTHrP	25
1.5.5. Vektoren	27
1.5.6. Gentransfer Systeme	29
1.5.7. Gentherapeutisch optimierte Knochenmarkkoagulate als Gentransfersystem	31
1.6. Fragestellung	34

2. MATERIAL UND METHODEN	36
2.1. Studiendesign	36
2.2. Vektorpräparation	38
2.3. Chirurgische Intervention und Gentransfersystem	38
2.4. Euthanasie	40
2.5. Aufbereitung für histochemische Analysen	40
2.5.1. Fixation und Demineralisierung	41
2.5.2. Paraffineinbettung und Mikrotomschnitte	41
2.5.3. Entparaffinierung & Rehydrierung	42
2.5.4. Hämatoxylin Eosin [HE] Färbung	42
2.5.5. Alcianblau Färbung	44
2.5.6. Safranin-O / Fast-green Färbung	44
2.5.7. Polarisierte Lichtmikroskopie [PLM]	45
2.6. Aufbereitung für immunhistochemische Analysen	45
2.7. Digitalisierung der histologischen Schnitte	48
2.8. Histologische Analyse: ICRS II Histology Scoring System	48
2.9. Typ II Kollagen Histomorphometrie	51
2.10. Statistische Auswertung	53
2.10.1. Reliabilität	53
2.10.2. Deskriptive Statistik	54
2.10.3. Signifikanztest	54

3. ERGEBNISSE	55
3.1. Qualitative Beschreibung	55
3.2. Reliabilität: Korrelation zwischen den Bewertern	57
3.3. Efficacy: Primäre Outcome Measures	57
3.3.1. ICRS II – Generelles Assessment	57
3.3.2. Typ II Kollagen positive Fläche (%)	59
3.4. Efficacy: Explorative Outcome Measures	59
3.4.1. ICRS II Parameter	59
3.4.2. Marker chondrozytärer Hypertrophie	60
3.4.3. Proteoglykan/Glycosaminoglykan Deposition	63
4. DISKUSSION	66
4.1. BMP-2 für die Gelenkknorpelregeneration	66
4.1.1. Chondrogene Wirkung von BMP-2 in-vivo	66
4.1.2. Osteophytenformation durch BMP-2 in-vivo: Eine Meta-Analyse	69
4.1.3. Modulation der Osteophytenformation	72
4.1.4. Klinische Anwendung von BMP-2 zur in-vivo Knorpelreparation	73
4.2. IHH für die Gelenkknorpelregeneration	74
4.2.1. Chondrogene Wirkung von IHH in-vivo	75
4.2.2. Klinische Anwendung von IHH zur in-vivo Knorpelreparation	77
4.3. Autologe gentherapeutisch optimierte Knochenmarkkoagulate für die Gelenkknorpelregeneration	78
4.3.1. Effektivität	78
4.3.2. Sicherheitsbedenken und mögliche Einsatzgebiete des Gentransfersystems	79
4.3.3. Alternative Protein-Delivery-Systeme	81

4.4. Methodische Aspekte dieser Studie	82
4.4.1. Statistische Power	82
4.4.2. Verwendete Outcome Measures	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	85
6. LITERATURVERZEICHNIS	90
7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	112

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der Gelenkknorpelläsion

Gelenkknorpelläsionen stellen keine gesonderte Kategorie in der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10-GM) dar. Inzidenz, Prävalenz und sozioökonomische Belastung dieser Entität sind keinem nationalen Register zu entnehmen. Die hier getroffenen Aussagen über die Epidemiologie der Gelenkknorpelläsionen und ihrer Folgen, basieren auf den in Tabelle 1-1 und Tabelle 1- 2 erläuterten Veröffentlichungen und Kalkulationen.

In Deutschland wird die Inzidenz der arthroskopisch diagnostizierten, fokalen Gelenkknorpelläsionen auf 318 274 (315 744 – 320 804; 95% CI) Läsionen pro Jahr geschätzt. Für die USA betragen die Schätzungen 625 347 (620 773 – 630 715; 95% CI) jährliche Diagnosen. Am häufigsten betroffen ist die retropatellare Gelenkfläche, sowie die mediale Femurkondyle [1]. Eine fokale Gelenkknorpelläsion ist ein bedeutender Risikofaktor für die Arthrose des betroffenen Gelenkabschnittes. Anhand von longitudinalen Studien kann das absolute Risiko für röntgenologisch gesicherte Gelenkspaltverschmälerung 10 Jahre nach der Diagnose auf 30% geschätzt werden [2]. Bei einem durchschnittlichen Alter von 43 Jahren bei Diagnosestellung [1] ist somit in der überwiegenden Zahl der Fälle von der Entwicklung einer posttraumatischen Gonarthrose vor dem Rentenalter auszugehen, einhergehend mit schmerzhafter Mobilitätseinschränkung für das betroffene Individuum, sowie großer sozioökonomischer Belastung.

Letztlich mündet die sekundäre Arthrose in den frühzeitigen Gelenkersatz. Die jährliche Rate des primären Kniegelenkersatzes aufgrund posttraumatischer Ätiologie, wird in Deutschland auf 17 117 und in den USA auf 64 448 geschätzt.

1. Einleitung

Tabelle 1-1 Inzidenz fokaler Gelenkknorpelläsionen des Kniegelenkes in Deutschland und den USA: Kalkulation

	GER	USA
Inzidenz fokaler Gelenkknorpelläsionen *	318 274 ± 2 530 [0.629 ± 0.005 * 506 000]	625 347 ± 4 971 [0.629 ± 0.005 * 994 192]
Häufigkeit des Kniegelenkseratzes aufgrund posttraumatischer Arthrose pro Jahr **	17 117 [0.098 * (0.00213 * 82 000 000)]	64 448 [0.098 * (0.00213 * 308 745 538)]

* Inzidenz arthroskopisch diagnostizierter Gelenkknorpelläsionen. Die Kalkulation basiert auf dem absolutem Risiko für das Vorliegen fokaler Gelenkknorpelläsionen von 0.629 (0.624 – 0.634; 95% CI) [1] und der geschätzten Zahl der in Deutschland und in den USA durchgeführten Kniegelenksarthroskopien von 506 000 (bezogen auf die Jahre 1995/96) [4], beziehungsweise 994 192 (bezogen auf das Jahr 2006) [4].

** Häufigkeit des Kniegelenkseratzes aufgrund posttraumatischer Gonarthrose pro Jahr. Die Kalkulation basiert auf dem geschätzten Anteil von 0.098 der posttraumatischen Ätiologie an der Gonarthrose jeglicher Ätiologie [5], der jährlichen Rate des primären Kniegelenkseratzes von 0.00213 pro Einwohner in Deutschland und in den USA (bezogen auf das Jahr 2009) [6] und der Einwohnerzahl von 82 000 000 in Deutschland (bezogen auf das Jahr 2008) [7]. und 308 745 538 in den USA (bezogen auf das Jahr 2010) [8].

Wie in Tabelle 1-2 dargelegt, wird die Prävalenz posttraumatischer Gonarthrose auf 3 654 449 US-Bürger geschätzt. Dadurch entstehen jährlich direkte und indirekte Krankheitskosten von insgesamt 10.13 Milliarden U.S. Dollar [USD].

Gelenkknorpelläsionen werden durch Schmerzen, Schwellungen und Einschränkungen der Kniegelenksfunktion symptomatisch. Die betroffenen Patienten leiden unter einer Mobilitätseinschränkungen und eingeschränkter Lebensqualität. Trotz arthroskopischer Behandlung zeigte Schneider eine durchschnittliche Schmerzintensität von 3.2 cm (\pm 3.1 cm SD) auf der Visuellen Analog Skala [VAS] von 0 - 10 cm in der Langzeit-Nachkontrolle nach einem Knorpelrekonstruktionsverfahren [9].

Es resultiert aus individueller und sozioökonomischer Sicht ein Bedarf an effektiven Präventions- und Therapiestrategien.

1. Einleitung

Tabelle 1-2 Prävalenz und Kosten der posttraumatischer Gonarthrose den USA: Kalkulation

	Beschreibung	Wert	Quelle oder Rechenformel
1	Prävalenz posttraumatischer Gonarthrose in Iowa in 2001	34 700	Brown et al., 2006 [5]
2	Einwohnerzahl von Iowa in 2001	2 931 593	Brown et al., 2006 [5]
3	Einwohnerzahl von Iowa in 2010	3 046 355	U. S. Census Bureau, 2010 [8]
4	Einwohnerzahl der USA in 2010	308 745 538	U. S. Census Bureau, 2010 [8]
5	Verhältnis der Einwohnerzahl von Iowa in 2010 zu 2001	1.0391	3 / 2
6	Verhältnis der Einwohnerzahlen der USA zu Iowa in 2010	101.3492	4 / 3
7	Prävalenz posttraumatischer Gonarthrose in Iowa in 2010	36 058	1 x 5
8	Prävalenz posttraumatischer Gonarthrose in den USA in 2010 *	3 654 449	7 x 6
9	Direkte Krankheitskosten durch AORC in den USA in 2003 **, ***	80 800 000 000	Yelin et al., 2007 [10]
10	Indirekte Krankheitskosten durch AORC in den USA in 2003 **, ***	47 000 000 000	Yelin et al., 2007 [10]
11	Gesamte Krankheitskosten durch AORC in den USA in 2003 **, ***	127 800 000 000	9 + 10
12	Prävalenz von AORC in den USA in 2003 **	46 100 000	Yelin et al., 2007 [10]
13	Durchschnittliche gesamte Krankheitskosten pro AORC Patient in den USA in 2003 **, ***	2 772	11 / 12
14	Gesamte Krankheitskosten durch posttraumatische Gonarthrose in den USA in 2010 ***, ****	10 130 130 000	8 x 13

* Die Prävalenz der posttraumatischen Gonarthrose in den USA im Jahr 2010 wurde durch ein „bottom-up“ Verfahren ermittelt. Herangezogen wurden die Schätzungen von Brown et al., welche die Ergebnisse eines Kollektivs der University of Iowa Hospitals and Clinics von 2001 auf den Staat Iowa extrapolierten [5]. Diese wurden anhand der Daten des US Census Bureau an die gewachsene Einwohnerzahl Iowas von 2010 angepasst und anschließend auf die gesamte Einwohnerzahl der USA extrapoliert [8]

** Der Begriff Arthritis and other rheumatic conditions [AORC] umfasst auch die Arthrose [engl. osteoarthritis]

*** Kosten beziehen sich auf ein Kalenderjahr und sind in USD angegeben

**** Die gesamten Krankheitskosten durch posttraumatische Gonarthrose in den USA in 2010 wurden durch ein „top-down“ Verfahren ermittelt. Hierbei wurden die gesamten Krankheitskosten der USA für AORC in 2003 [10] herangezogen, um die jährlichen Kosten pro AORC Patient zu ermitteln. Anhand dieser Fallkosten und der Prävalenz der posttraumatischen Gonarthrose in 2010 wurden die gesamten Krankheitskosten letzterer in den USA in 2010 ermittelt. Eine Anpassung der Krankheitskosten pro Patient von 2003 zu 2010 wurde nicht durchgeführt, da für den Zeitraum von 1997 auf 2003 gezeigt wurde, dass der Anstieg der Gesamtausgaben hauptsächlich durch die gestiegene Prävalenz begründet wurde und weniger auf gestiegene Fallkosten zurückzuführen war [10]. Die Fallkosten für AORC und posttraumatische Gonarthrose wurden als gleich angenommen.

1.2. Anatomie des Gelenkknorpels

Eine besondere Art des hyalinen Knorpels überzieht die artikulierenden Gelenkpartner in Diarthrosen: Hyaliner Gelenkknorpel. Dieser setzt sich, wie jede Form des adulten Knorpels aus Extrazellulärer Matrix [EZM] und den eingebetteten Chondrozyten zusammen. Hyaliner Gelenkknorpel ist avaskulär und nicht von einem Perichondrium umgeben. Daher erfolgt die Nährstoffversorgung durch Diffusion der Synovia [11]. Bereits 1925 lieferte Benninghoff eine detaillierte Beschreibung der Morphologie hyalinen Gelenkknorpels [11], welche im Folgenden dargelegt wird. Aufbauend auf dieser frühen Beschreibung wurden umfangreiche weitere Erkenntnisse über Biochemie, Biomechanik, Zytologie und Embryologie des hyalinen Gelenkknorpels gewonnen, die anschließend dargestellt werden.

1.2.1. Morphologie des Gelenkknorpels

Benninghoff beschrieb vier horizontale Zonen des hyalinen Gelenkknorpels, mit charakteristischen morphologischen Eigenschaften: Die Tangentialzone, die Transitionszone, die Radiärzone und die Kalzifizierte Zone [11].

Die Tangentialzone ist gekennzeichnet durch eine zur Oberfläche tangentialen Orientierung der Kollagenfaserbündel und durch eine Spindelform der Chondrozyten. Als *Benninghoff'sche* Arkaden erstrecken sich die Kollagenfasern bis zur Kalzifizierten Zone, wobei sie charakteristischer Weise ihre Orientierung [11] und ihren Durchmesser [12] ändern. Dieser beträgt etwa 100 nm in der Tangentialzone [12]. In der Aufsicht ist die Gelenkknorpeloberfläche ebenfalls durch einen parallelen Verlauf der Kollagenfaserbündel gekennzeichnet. Dieser Verlauf, benannt als *Hultkranz'sche* Spaltlinien, ist abhängig von der Gelenksregion [11] und hat

möglicherweise Einfluss auf das Ergebnis von Knorpeltransplantationen [13, 14]. Die Transitionszone beschreibt den Übergang der Kollagenfaserbündel der Tangentialzone in die zur Knorpeloberfläche orthogonalen Orientierung der Radiärzone [11]. Letztere ist gekennzeichnet durch radiäre Säulen aus Chondrozyten und EZM [11] mit Kollagenfaserbündel-Durchmessern von 100 bis zu 1000 nm [12]. Die Tiefe der Radiärzone bestimmt im Wesentlichen die Dicke des Gelenkknorpels [11]. Zur oberflächenfernen Seite wird die Radiärzone durch die Tidemark begrenzt, unterhalb welcher sich Kalkeinlagerungen in der EZM finden. Die Tidemark ist ein Netzwerk aus verzweigten Kollagenfasern und vermag möglicherweise einwirkende Kräfte auf die gesamte subchondrale Grenzfläche zu verteilen und ein Ausreißen der Kollagenfaserbündel aus der kalzifizierten Verankerung zu verhindern [12]. Die dünne subchondrale Kompakta trennt den avaskulären Gelenkknorpel von der vaskularisierten subchondralen Spongiosa [11]. Abbildung 1-1 zeigt die zonale Architektur und die Zusammensetzung des Gelenkknorpels.

1.2.2. Biochemie des Gelenkknorpels

Hyaliner Gelenkknorpel besteht zu 90 – 99% aus EZM, welche sich überwiegend aus Wasser, Kollagenfasern und Proteoglykanen zusammensetzt [17]. Tabelle 1-3 zeigt die prozentuale Zusammensetzung des Gelenkknorpels, dessen Hauptbestandteile im Folgenden näher beschrieben werden.

1. Einleitung

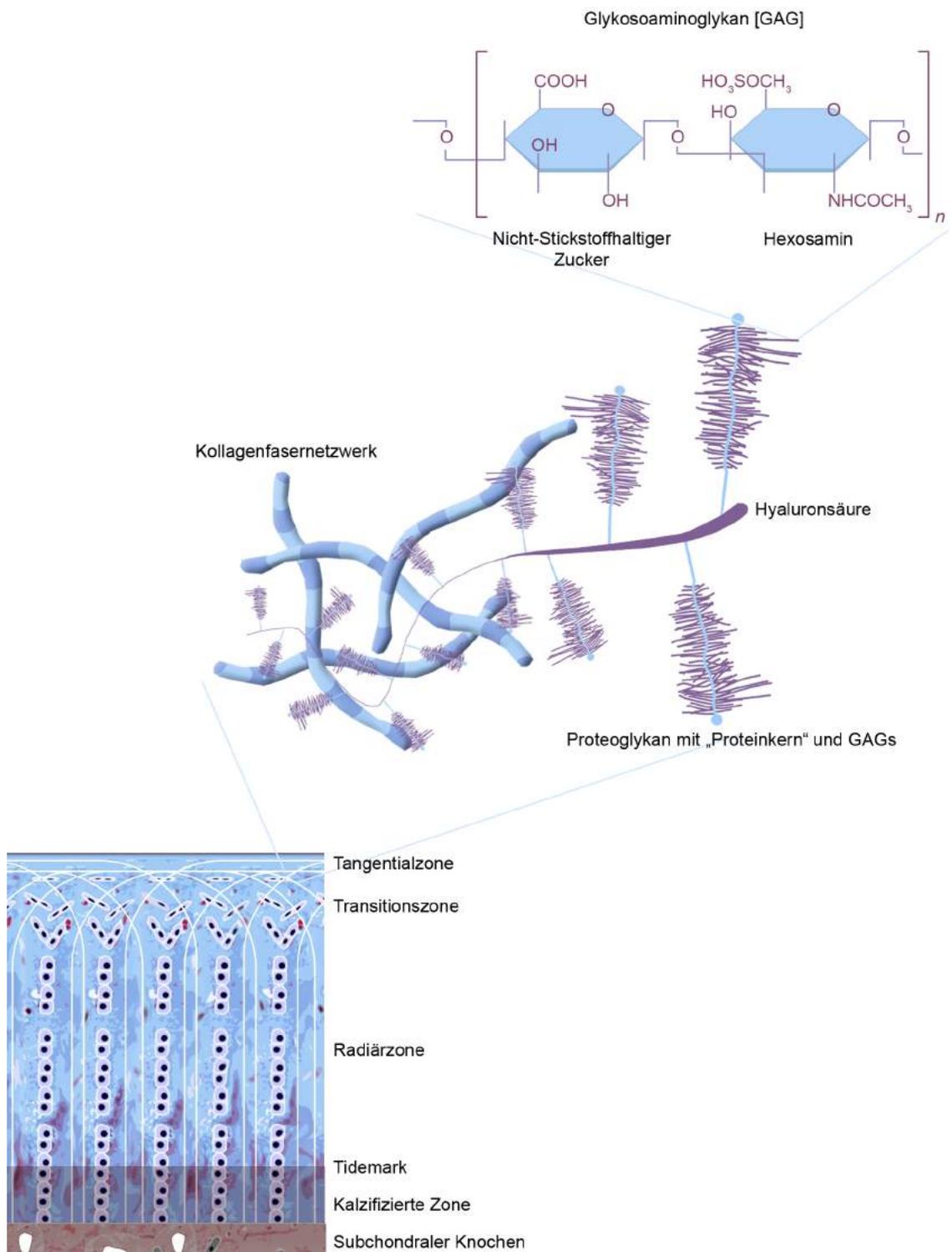


Abbildung 1-1 Zonale Architektur und Zusammensetzung des Gelenknorpels [modifiziert nach 15, 16].

Schematisch dargestellt ist der Gelenknorpel mit der Unterteilung in seine Zonen. Die EZM besteht aus einem Kollagenfaser-Proteoglykan Netzwerk. Proteoglykane [PGs] sind wiederum über lange Hyaluronsäure-Moleküle verbunden. PGs bestehen aus einem Proteinkern und gebundenen Glykosaminoglykanen [GAGs]. GAGs sind Disaccharid-Ketten aus unterschiedlichen Aminosukzern und nicht-stickstoffhaltigen Zuckermolekülen.

Tabelle 1-3 Zusammensetzung des Gelenkknorpels [modifiziert nach 17]

Bestandteil	Anteil am Knorpelvolumen
Chondrozyten	1 - 10%
EZM	90-99%
Wasser	70-80%
Kollagen	12-14%
- Typ II	10-12%
- Typ IX	≈ 1%
- Typ XI	≈ 1%
- weitere Typen	
Proteoglykane	7-9%
- Hyaluronsäure-Proteoglykan-Aggregate	6-8%
- Andere Proteoglykane (Decorin, Biglykan, Fibromodulin)	≈ 1%
Mineralsubstanzen	< 4%
Andere Matrixproteine	< 1%

Kollagen Typ II:IX:XI Heteropolymere sind die vorherrschenden Fasern im adulten Gelenkknorpel. Kollagen Typ II stellt mit einem Anteil von über 90% des Gesamtkollagens [18] einen Marker für den Gelenkknorpel dar. Durch die Abwesenheit von Kollagen Typ I kann hyaliner Gelenkknorpel von Faserknorpel differenziert werden [19]. Die faserbildenden Kollagentypen II und XI werden durch Kollagen Typ IX über kovalente Bindungen quervernetzt [20]. Letztere erhöhen die mechanische Integrität des Kollagenfasernetzwerkes und tragen zu den biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels bei [18]. Die Kollagentypen VI, XII und XIV stellen einen Anteil < 1% am Gesamtkollagen des Gelenkknorpels dar [18]. Kollagen Typ X als Marker der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten des Gelenkknorpels [19] findet sich in Anteilen der Wachstumsfuge [21], in der Kalzifizierten Zone [19], sowie im arthrotischen Gelenkknorpel [22].

Als Proteoglykane [PGs] werden Moleküle bezeichnet, die aus einem „Proteinkern“ und kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen bestehen [16]. Glykosaminoglykane [GAGs] sind langkettige Heteropolysaccharide, bestehend aus sich wiederholenden Disacchariden. Die Disaccharide bestehen je aus einem Hexosamin und einem nicht-stickstoffhaltigen Zucker, verknüpft durch eine glykosidische Bindung [16]. Durch elektrostatische Wechselwirkungen der anionischen Carboxygruppen und Sulfatierungen, dehnen sich PGs aus und stoßen sich gegenseitig ab [16]. Zusammen mit der großen Wasserbindungskapazität beeinflussen diese Eigenschaften wesentlich die Biomechanik des Gelenkknorpels [16]. Aggrecan stellt den überwiegenden Anteil der PGs im Gelenkknorpel. Es trägt Chondroitin 6- und Keratan-Sulfat Seitenketten. Hyaluronsäure ist ein besonders großes Glykosaminoglykan [GAG], welches wiederum mehrere Aggrecan-Moleküle über Link-Proteine zu verbinden vermag [15]. Tabelle 1-4 fasst bedeutende GAGs des Gelenkknorpels, ihre Zuckerkomponenten und die Art ihrer anionischen Gruppen zusammen. Das Verhältnis von PGs zu Kollagenfasern ist in geschädigtem Gelenkknorpel reduziert [23], daher gilt eine hohe PG-Konzentration im Knorpelgewebe als Marker einer hohen Knorpelqualität [19]. Die PG-Konzentration ist in der Radiärzone am höchsten [24].

Tabelle 1-4 Glykosaminoglykane des Gelenkknorpels [modifiziert nach 16]

Glykosaminoglykan	Disaccharid-Bestandteile	Anionische Gruppen
Chondroitin 6-Sulfat [CS-6]	N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure	Carboxy und Sulfat
Chondroitin 4-Sulfat [CS-4]	N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure	Carboxy und Sulfat
Keratan-Sulfat	N-Acetylgalactosamin und Galactose	Sulfat
Hyaluronsäure	N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure	Carboxy

1.2.3. Biomechanik des Gelenkknorpels

Intakter Gelenkknorpel kann Stoßkräfte absorbieren und Reibungskräfte an der Knorpeloberfläche reduzieren. Die Stoßabsorption lässt sich vereinfacht erklären, wenn der Gelenkknorpel als biphasisches Material betrachtet wird. Das Kollagen-PG-Netzwerk repräsentiert die solide Phase, während das gebundene Wasser und die gelösten Mineralsubstanzen die flüssige Phase darstellen. Zu der bereits beschriebenen Expansionstendenz der PGs kommen Reibungskräfte beim Fluss des Wassers durch das Kollagen-PG-Netzwerk hinzu. Diese Reibung wird unter Kompression des Gelenkknorpels weiter verstärkt, da die Porosität des Kollagen-Netzwerkes abnimmt [25]. Die Synovia vermittelt durch ihren Hyaluronsäure- und Lubricin-Gehalt die Lubrikation der Gelenkknorpeloberfläche und reduziert Reibungs- und Zugkräfte [25]. Die mechanische Beanspruchung von Gelenkknorpel stellt zudem einen Stimulus auf Chondrozyten dar und beeinflusst dadurch Proliferation und Proteinsynthese [26].

1.2.4. Zytologie des Gelenkknorpels

Chondrozyten liegen im adulten Gelenkknorpel in einer sehr geringen Dichte von etwa 10^7 / ml vor [27]. In der Radiärzone ist diese am niedrigsten, jedoch zeigen die Chondrozyten dort die höchste Proliferationskapazität und Proteinsyntheserate. Letzteres bedingt ihr stark ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum und ihren ausgeprägten Golgi-Apparat [27]. Chondrozyten können sowohl anabol, etwa durch Kollagen- und PG-Synthese, als auch katabol, etwa durch Synthese von Matrix-Metalloproteinasen [MMPs], auf den Gelenkknorpel wirken [28]. Ansammlungen von Knorpelzellen und der sie umgebende Knorpelhof werden als Chondrone oder Territorien, bzw. in

arthrotischem Gelenkknorpel als Cluster bezeichnet. Cluster entstehen durch Proliferation der Chondrozyten und der Deposition von synthetisierten EZM-Bestandteilen in der Umgebung. Die gesteigerte Synthese und Sekretion ist jedoch nicht ausreichend potent, um die EZM zwischen den Chondronen, die Interterritorien, zu regenerieren [27]. Aufgrund der niedrigen Sauerstoffverfügbarkeit im avaskulären Gelenkknorpel betreiben Chondrozyten einen überwiegend anaeroben Stoffwechsel [27].

1.2.5. Entwicklung des Gelenkknorpels

Die Entwicklung der meisten Skelettelemente beginnt mit der Entwicklung von Knorpelanlagen. Die Chondrogenese wird initiiert durch lokalisierte Proliferation mesenchymaler Stammzellen. Die proliferierten Zellen kondensieren, vermittelt durch neuronales Cadherin [N-Cadherin] und Neuronale Zelladhäsionsmoleküle [NCAM]. Es folgt die, unter anderem durch Synthese von EZM-Bestandteilen gekennzeichnete, chondrogene Differenzierung [29]. Die biochemische Komposition des unreifen Gelenkknorpels unterscheidet sich quantitativ von der des adulten Gelenkknorpels. Der Anteil von Kollagen Typ IX und XI verringert sich bei der Reifung von je etwa 10% auf 1% beziehungsweise 3%, während der Anteil von Typ II Kollagen von unter 80% auf über 90% ansteigt [18].

Anhand der Knorpelanlagen entstehen anschließend durch perichondrale und enchondrale Ossifikation die knöchernen Anteile des Bewegungsapparates. Erhalten bleibt der Gelenkknorpel, sowie bis zum Abschluss des Längenwachstums der Knorpel der Epiphysenfugen. Innerhalb der Epiphysenfuge zeigt sich ebenfalls eine zonale Gliederung. Von gelenknah nach gelenkfern lassen sich die Reservezone, Proliferationszone, hypertrophe Zone, Eröffnungszone und Ossifikationszone unterscheiden. Durch

Proliferation der Chondrozyten entstehen isogene Zellsäulen, getrennt von Longitudinalsepten aus EZM. Innerhalb der hypertrophen Zone findet die hypertrophe Differenzierung und Initiation der EZM Mineralisierung statt. Sie ist gefolgt von Apoptose, Resorption der Zellreste, Vaskularisierung und schließlich der Entstehung primärer Knochentrabekel aus den mineralisierten Longitudinalsepten [30].

Knochenmorphogenetische Proteine [engl. Bone morphogenetic proteins; BMPs] vermögen es, die Kondensation und chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Zellen in-vitro und in-vivo zu fördern. Sie steigern einerseits die Proliferation innerhalb der Epiphysenfuge, jedoch ebenso die hypertrophe Differenzierung [31]. Indian Hedgehog protein [IHH, kodiert von *IHH*] ist, vermittelt durch Parathyroid hormone related protein [PTHrP, kodiert von *PTHrP*], inhibierend an der Regulierung der hypertrophen Differenzierung innerhalb der Wachstumsfuge beteiligt [31], wie in Kapitel 1.5 Gentherapie der Gelenkknorpelläsion näher erläutert wird.

1.3. Pathologie des Gelenkknorpels

1.3.1. Ätiologie, Pathomechanismus und Heilungskapazität

Gelenkknorpelschäden beruhen auf unterschiedlichen Ätiologien. Im Rahmen einer Arthrose liegen großflächige Knorpelschädigungen vor. Im heutigen Verständnis ist die Arthrose eine Erkrankung des gesamten Gelenkes unter Mitbeteiligung der Synovialmembran, der restlichen Gelenkkapsel und des Knochens [32]. Ätiologien und Pathomechanismen sind noch nicht abschließend geklärt, umfassen jedoch die vermehrte mechanische Belastung, Entzündungsprozesse, sowie hormonelle Störungen und Stoffwechselerkrankungen [33]. Die posttraumatische Arthrose ist insbesondere durch vermehrte mechanische Belastung, beispielsweise im

Bereich um eine fokale, hochgradige Knorpelläsion bedingt. Des Weiteren sind langfristig Inflammation, Knorpelkatabolismus und Lubrikationsdefizit an der Entstehung der posttraumatischen Arthrose aus fokalen Knorpelläsionen beteiligt [34]. Fokale Gelenkknorpelschäden entstehen entweder durch Traumata, bis hin zu der intraartikulären Fraktur oder durch eine gestörte Blutversorgung, wie bei der Osteochondrosis dissecans [OCD]. Letztere sind insbesondere im jüngeren Patientenalter von Bedeutung, spielen jedoch in Kollektiven höheren Alters eine untergeordnete Rolle. Die OCD bedingte in einem Kollektiv von 31 516 diagnostischen Kniegelenksarthroskopien 0,7% der fokalen Knorpelläsionen [1].

Der traumatischen Knorpelläsionen zugrunde liegende Pathomechanismus beruht auf der sofortigen Ruptur des Kollagenfasergrundgerüsts der EZM durch die Krafteinwirkung. Akut folgt die Nekrose und subakut die Apoptose der Chondrozyten, je nach Grad der mechanischen Schädigung [34, 35]. Es kommt zur gesteigerten Synthese von MMPs, welche den Abbau der geschädigten EZM ermöglichen und somit die Entstehung eines chondralen Defektes fördern [34]. Mankin beschreibt eine Heilungsreaktion in Chondrozyten in der Umgebung der Läsion, welche die Proliferation und Synthese von Matrixbestandteilen beinhaltet. Diese ist jedoch insuffizient und kurzlebig und vermag somit nicht das Entstehen der chondralen Läsion zu verhindern [36]. Wird allerdings der subchondrale Knochen durchbrochen und Anschluss zum Knochenmark oder Gefäßsystem hergestellt, entsteht ein Koagel, welches Wachstumsfaktoren und mesenchymale Zellen beinhaltet und somit zur Bildung eines faserknorpeligen Reparationsgewebes fähig ist [37]. Letzteres ist durch minderwertige biomechanische Eigenschaften gekennzeichnet [38]. Zusammenfassend kann die intrinsische Heilungskapazität bei isolierten chondralen Läsionen den Substanzverlust nicht ausgleichen, während bei osteochondralen Läsionen eine Defektfüllung mit minderwertigem Reparationsgewebe möglich ist. Weiterhin wird die Heilungskapazität durch das Alter, Defektlokalisierung und Defektgröße bestimmt [39].

1.3.2. Defektgröße und Defektgrad

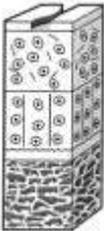
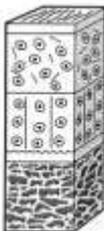
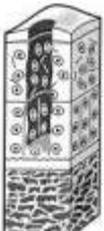
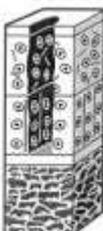
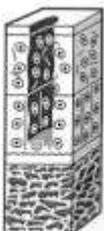
In die Entscheidung über die adäquate Therapie werden verschiedene Faktoren einbezogen, die in Tabelle 1-7 zusammengetragen sind. Sie werden durch Anamnese, körperliche Untersuchung, bildgebende Verfahren und der Arthroskopie erhoben. Mittels Letzterer kann die Defektgröße, im Sinne der Flächenausdehnung, sowie die als Defektgrad bezeichnete Tiefenausdehnung erfasst werden. Minas beschreibt eine kritische Defektgröße von 2 cm², oberhalb welcher die Abstützung durch die angrenzenden Knorpelschultern insuffizient zu werden scheint [40]. Diese kritische Defektgröße ist aktuell noch nicht ausreichend von klinischen Daten gestützt und eine Anpassung der definierten Fläche bei Verfügbarkeit neuer Daten ist wahrscheinlich. Beispielsweise beschreibt Widuchowski 15 Jahre nach Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes, dass die Patientengruppe mit isolierten hochgradigen Knorpelläsionen mit durchschnittlich 2,1 cm² Defektgröße im International Knee Documentation Committee [IKDC] Score keinen bedeutenden Unterschied zu den Patienten ohne chondrale Läsion zeigt [41].

Die Graduierung erfolgt anhand der Outerbridge Klassifikation [42] oder der „Articular cartilage injury classification“ der International Cartilage Repair Society [ICRS] [43]. Die durch Outerbridge zur Beschreibung der Chondromalacia patellae genutzte Klassifikation, wurde von Lysholm und anderen Autoren zur Bewertung fokaler Gelenkknorpelläsionen modifiziert [44]. Die Grade 1 bis 3 sind in beiden Systemen vergleichbar. Grad 4 Läsionen reichen in der modifizierten Outerbridge Klassifikation jedoch nur bis zur intakten subchondralen Kompakta, während diese in Grad 4 Läsionen nach der ICRS Klassifikation durchbrochen ist. Tabelle 1-5 zeigt die ICRS Klassifikation zur arthroskopischen Graduierung von Knorpelschäden.

Wenn eine operative Behandlung indiziert ist, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Diese werden in Kapitel 1.4 dargestellt.

1. Einleitung

Tabelle 1-5 „ICRS-Articular cartilage injury classification“ [modifiziert nach 43]

D	C	B	A	Defektmorphologie	ICRS Grad
				Normal	0
				Annähernd normal Oberflächliche Läsionen, leichte Einkerbungen (A) und/oder oberflächliche Fissuren und Spaltbildungen (B)	1
				Abnormal Läsionen erreichen < 50% der Knorpeltiefe	2
				Ausgeprägt abnormal Läsionen erreichen > 50% der Knorpeltiefe (A), die kalzifizierten Schicht (B), oder den subchondralen Knochen (C), oberflächliche Erhebungen eingeschlossen (D)	3
				Ausgeprägt abnormal Läsionen durchbrechen die subchondrale Lamelle (A), oder reichen in den subchondralen Knochen (B)	4

1.4. Klinische Therapieverfahren der Gelenkknorpelläsion

1.4.1. Übersicht über die verfügbaren Therapieverfahren

Zur operativen Behandlung von Gelenkknorpelläsionen stehen verschiedene arthroskopische und offene operative Verfahren zur Verfügung. Das Spektrum reicht von arthroskopischer Lavage und Débridement, über markraumeröffnende Verfahren, bis hin zu restaurativen Verfahren wie die Autologe Chondrozytentransplantation [ACT] und die Transplantation von autologen osteochondralen Zylindern. In Tabelle 1-6 sind diejenigen Verfahren zusammengetragen, die bis zur klinischen Anwendung entwickelt wurden.

Markraumeröffnende Verfahren zielen auf die Auslösung der intrinsischen Heilungsreaktion ab. Demnach führen sie überwiegend zur Entstehung eines faserknorpeligen Reparationsgewebes. Dieses vermag eine initiale Symptomlinderung zu vermitteln, wird jedoch von signifikanter Verschlechterung der klinischen Präsentation gefolgt [45]. Diese Resultate mögen durch die histologische und biomechanische Insuffizienz des faserknorpeligen Reparationsgewebes bedingt sein.

Restorative Verfahren zielen auf die Wiederherstellung des Gelenkknorpels mitsamt seiner charakteristischen histologischen und biomechanischen Eigenschaften ab, um dauerhafte Symptombefreiheit zu erzeugen. Dies soll entweder durch ein Gelenkknorpeltransplantat oder ein Gelenkknorpelregenerat erfolgen. Die osteochondrale autologe Transplantation liefert intaktes Gelenkknorpelgewebe, ist jedoch durch insuffiziente Integration [46], anatomische Unterschiede zwischen Entnahme- und Transplantationsstelle [13, 14] und Entnahmemorbidität [47] limitiert. Letztere ist bei der ACT, welche nur eine Biopsie des nativen Gelenkknorpels voraussetzt, reduziert. Die Invasivität ist noch geringer, wenn Knochenmarkstromazellen [BMSCs] verwendet werden, da diese durch eine Knochenmarkpunktion gewonnen werden können [48]. Trotz der Beobachtung hyaliner Gelenkknorpelregeneration in einem Anteil der durch ACT behandelten

Patienten [49, 50] müssen Aussagen über die Effektivität des Verfahrens vorsichtig betrachtet werden. Biopsien mögen nicht die Qualität des gesamten Reparationsgewebes abbilden und werden typischerweise nicht bei allen, in einer Studie eingeschlossenen, Patienten durchgeführt. Die ACT scheint dennoch häufiger zu hyaliner Gelenkknorpelregeneration zu führen, als die Mikrofrakturierung. In Biopsien zwei Jahre nach ACT beschrieb Knutsen et al. in 19% (6 von $n = 32$) der mit ACT und in 11% (4 von $n = 35$) der mit Mikrofrakturierung behandelten Patienten eine hyalin-artige Gelenkknorpelregeneration. Der Studie mangelte es jedoch an statistischer Power um diese Differenz auf dem konventionellen Signifikanzlevel zu zeigen [50]. Saris zeigte eine signifikante Überlegenheit der Charakterisierten Chondrozyten Implantation [CCI] gegenüber der Mikrofrakturierung bezüglich des allgemeinen Assessments, des Chondrozytenphänotyps und der Gewebestruktur, unter der Benutzung des ICRS II Histological Scoring System [ICRS II] [51]. Dennoch bleibt eine bedeutende Zahl an Patienten, die nach ACT faserknorpeliges Reparationsgewebe aufweisen [50]. Dies lässt die Frage nach den biologischen Hindernissen zellbasierter Therapien aufkommen, welche in Kapitel 1.4.2. dargestellt werden.

Externe Evidenz zur Auswahl der Therapiemethode ist spärlich. Meta-Analysen sind durch große Unterschiede in der Behandlungsmethodik und den verwendeten Outcome-Messinstrumenten der klinischen Studien limitiert [65, 66]. Um eine höhere Patientenzahl einschließen zu können, sind die Einschlusskriterien klinischer Studien zur Knorpelreparation meist weit gefasst. Dies bezieht sich insbesondere auf das Patientenalter [49, 51, 67-69], die Defektgröße [49, 67, 68], die Defektlokalisation [49, 67], sowie den Einschluss von Patienten mit multiplen Läsionen [49, 67]. Trotz des Bedarfes an hochqualitativen klinischen Studien, existieren praxisbasierte Therapiealgorithmen. Diese schließen Symptomatik und Defektgröße, Aktivitätsansprüche des Patienten und den Patientenwunsch bezüglich des Therapieverfahrens ein. Sie beinhalten Eskalationsstufen, falls weniger aufwendige Verfahren klinisch versagen [40].

1. Einleitung

Tabelle 1-6 Verfahren zur Therapie fokaler Gelenkknorpelläsionen in klinischer Anwendung

Behandlung	Quelle
Lavage mit oder ohne Débridement	Hubbard, 1996 [52]
Markraumeröffnende Verfahren	
<i>Pridie</i> Bohrungen	Pridie, 1959 [53]
Abrasionsarthroplastik	Johnson, 1986 [54]
Mikrofrakturierung	Steadman et al., 1999 [55]
Autologe Membran-induzierte Chondrogenese [AMIC]	Behrens, 2005 [56]
Zellbasierte restaurative Verfahren	
Autologe Chondrozyten Transplantation [ACT]	
1. Generation: Periost-bedeckte ACT [ACT-P]	Knutsen et al., 2004 [50], Brittberg et al., 1994 [57]
2. Generation: Kollagen-bedeckte ACT [ACT-C]	Haddo et al., 2004 [58]
3. Generation: Matrix-assoziierte Chondrozyten Implantation [MACI®, Genzyme Europe BV, Naarden, Niederlande]	Cherubino et al., 2003 [59]
Charakterisierte Chondrozyten Implantation [CCI]	Dell'Accio et al., 2001 [60], Saris et al., 2008 [51]
Transplantation von Knochenmark-Stromazellen [BMSCs]	Wakitani et al., 2004 [58]
Transplantation autologer Gewebe	
Periostale autologe Transplantation	Niedermann et al., 1985 [61]
Perichondriale autologe Transplantation	Homminga et al., 1990 [62]
Osteochondrale autologe Transplantation	
OATS [Osteochondral Autograft Transfer System®, Arthrex Inc., Naples, USA], Mosaikplastik	Matsusue et al., 1993 [63]
Mega-OATS	Imhoff et al., 1999 [64]

Des Weiteren nehmen die in Tabelle 1-7 aufgeführten Faktoren Einfluss auf das Behandlungsergebnis und somit auf die Therapieentscheidung und sollten daher bei jedem Patienten erfasst werden.

Tabelle 1-7 Faktoren mit Einfluss auf die Indikationsstellung zur Therapie von Knorpelläsionen des Kniegelenkes

Faktor	Quelle
Anamnese	
Ziele und Erwartungen des Patienten	vgl. Minas, 2011 [40]
Sozialer Rückhalt	vgl. Minas, 2011 [40]
Vorheriges Aktivitätslevel	vgl. Mithöfer et al., 2005b [70]
Alter	vgl. Mithöfer et al., 2005b [70]
Stärke der Symptomatik	vgl. Minas, 2011 [40]
Dauer der präoperativen Symptomatik	vgl. Mithöfer et al., 2005a [71], vgl. Mithöfer et al., 2005b [70]
Body Mass Index	vgl. Minas, 2011 [40]
Compliance, Drogenmissbrauch, Nikotinabusus	vgl. Minas, 2011 [40]
Vorbehandlungen	vgl. Minas, 2011 [40]
Körperliche Untersuchung, bildgebende Verfahren und Arthroskopie	
Gelenkachsenfehlstellungen	vgl. Minas, 2011 [40]
Status der Menisci	vgl. Minas, 2011 [40]
Status der Kreuz- und Kollateralbänder, Gelenkstabilität	vgl. Minas, 2011 [40]
Defektlokalisierung, -größe und -grad	vgl. Minas, 2011 [40]
Intraartikuläre Begleitpathologien, beispielsweise Dissekatate	vgl. Minas, 2011 [40]

Symptomatische Knorpelläsionen des Kniegelenkes unter 2 cm² werden bei Patienten mit niedrigem Aktivitätsanspruch durch arthroskopisches Débridement behandelt, während bei Patienten mit hohem Aktivitätsanspruch ein markraumeröffnendes Verfahren verwendet wird. Bei Defektgrößen über 2 cm² wird anhand der Patientenpräferenz ein markraumeröffnendes Verfahren oder die ACT empfohlen. Neben der ACT steht bei Läsionen unter 2 cm² die osteochondrale autologe Transplantation zur Verfügung, welche bei größeren Läsionen aufgrund der hohen Entnahmemorbidität nicht empfohlen wird [40].

1.4.2. Limitationen zellbasierter Verfahren

„Biologische Hindernisse der Regeneration hyalinen Neoknorpels umfassen die insuffiziente Differenzierung, den Verlust transplantierte Zellen und Gewebe, die Zerstörung der Matrix und das Versagen der Integration, welche alle durch verschiedene Ursachen bedingt sein können“ [29, Übersetzung Jakob Sieker].

Differenzierungsinsuffizienzen umfassen die ausbleibende chondrogene Differenzierung, den Verlust des chondrozytären Differenzierungszustandes, sowie die hypertrophe Differenzierung chondrogener Zellen mit nachfolgender Osteogenese in Analogie zu den Vorgängen der Epiphysenfuge [29]. Autologe Chondrozyten entdifferenzieren während ihrer Expansion in Monolayer-Kultur [72] und redifferenzieren nach Überführung in 3D-Kultursysteme [73]. Ihre Kapazität zur Redifferenzierung wird durch die Kulturbedingungen während der Expansion, wie etwa die Präsenz von adäquaten Wachstumsfaktoren, beeinflusst [73]. BMSCs können ebenfalls chondrogen differenzieren, wenn sie durch bestimmte Wachstumsfaktoren unter adäquaten Therapiebedingungen stimuliert werden [74]. Wachstumsfaktoren, die es vermögen, die chondrogene Differenzierung zu beeinflussen, werden im Kapitel 1.6 zusammengefasst. Extrazelluläre Wachstumsfaktoren können, in Form rekombinanter Proteine, leicht dem Kulturmedium in-vitro zugefügt werden [73], jedoch ist ihre in-vivo Anwendung schwierig [29]. Die in-vivo Applikation benötigt ein System zur Wachstumsfaktorfreisetzung, wie etwa funktionalisierte Matrices oder Gentherapie. Letztere ermöglicht die lokalisierte und anhaltende Wachstumsfaktor-Produktion [75]. Zudem ist die Gentherapie die einzige Methode, welche die Nutzung intrazellulärer Moleküle, wie etwa Transkriptionsfaktoren, ermöglicht [29].

1.5. Gentherapie der Gelenkknorpelläsion

„Somatische Gentherapie ist durch den Transfer funktionaler Gene in bestimmte Körperzellen, sowie deren Expression im Zielgewebe definiert“ [76]. Die Gene werden in Form der komplementären DNA [engl. complementary DNA, cDNA] transferiert. Die somatische Gentherapie ermöglicht die anhaltende lokale oder regionale Synthese bioaktiver Substanzen [77]. Werden Zellen nach ex-vivo Transduktion durch Adenoviren in Gelenkknorpelläsionen implantiert, zeigen diese über vier Wochen eine erhöhte Transkription der Ziel-mRNA [78]. Gemäß den Daten der in der *Journal of Gene Medicine Clinical Trial Database* [Wiley Database] registrierten Studien, wird die Gentherapie insbesondere zur Therapie von Krebserkrankungen (64.4%, $n = 1186$), monogenen Erkrankungen (8.7%, $n = 161$), kardiovaskulären Erkrankungen (8.4%, $n = 155$) und Infektionserkrankungen (8%, $n = 147$) erforscht (vgl. Wiley Database, 2012 Stand Juni 2012). Aktuell ist keine klinische Studie mit muskuloskelettaler Indikation registriert [79]. Die *Wiley Database* ist die umfassendste weltweite Datenbank klinischer Studien der Gentherapie, jedoch existieren auch nicht-registrierte Studien [80].

Muskuloskelettale Gentherapie wurde in präklinischen Studien zur Reparation von Knochen, Muskulatur, Sehnen, Ligamente, Menisci und Gelenkknorpel eingesetzt [77]. Die erste klinische Studie wurde von *Evans et al.* zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis durchgeführt [81]. In deren Rahmen wurden autologe Synoviozyten, nach retroviraler ex-vivo Transduktion von *Interleukin-1 Rezeptor Antagonist Protein* cDNA, in arthritische Metacarpophalangealgelenke von neun Patienten injiziert [81].

1.5.1. Gene zur Förderung der chondrogenen Differenzierung

Um in BMSCs chondrogene Differenzierung, Proliferation und Matrixsynthese zu fördern, stehen vielversprechende Gene als Kandidaten zur experimentellen Erprobung zur Verfügung. Diese Gene kodieren für sekretierte Proteine, inklusive Wachstumsfaktoren und EZM-Komponenten, sowie intrazelluläre Proteine, wie Signaltransduktionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren [82]. Vielversprechende sekretierte Wachstumsfaktoren umfassen die Proteine der Transforming growth factor- β [TGF- β] Superfamilie, wie etwa Bone morphogenetic proteins [BMPs] und Growth/differentiation factors [GDFs], sowie Wnts, Insuline-like growth factor-1 [IGF-1], Fibroblast growth factors [FGFs], Epidermal growth factor [EGF] und Platelet-derived growth factor [PDGF] [82, 83]. Die Gruppe der sekretierten EZM-Komponenten beinhaltet Typ II Kollagen und Cartilage oligomeric matrix protein [COMP] [82]. Die intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle umfassen SMADs, sowie die Transkriptionsfaktoren Sry-related HMG-box transcription factor 9 [Sox9], -5, -6 und Brachyury [82]. Tabelle 1-8 fasst die Gen-Kandidaten für Gentherapie von Gelenkknorpelläsionen unter Angabe ihres therapeutischen Mechanismus zusammen. Im Folgenden werden BMPs im Allgemeinen und Bone morphogenetic protein-2 [BMP-2, kodiert von *BMP2*] im Speziellen erläutert.

1.5.2. BMPs und BMP-2.

Die erste umfassende Beschreibung der BMPs stammt von Wozney im Jahre 1989 [84]. Zuvor entdeckte Urist im Jahre 1965, dass demineralisierte Knochenmatrix, oder deren Extrakt, nach Implantation zur ektopen Chondro- und Osteogenese führt [85].

1. Einleitung

Tabelle 1-8 Kandidaten für gentherapeutisch augmentierte Zell-basierte Therapie von Gelenkknorpelläsionen
[modifiziert nach 82, 83]

Protein	Therapeutischer Mechanismus
Sekretierte Wachstumsfaktoren	
TGF- β 1, 2, 3	Stimulation der chondrogenen Differenzierung, EZM-Synthese und/oder Proliferation
BMP-2, -4, -7	Stimulation der chondrogenen Differenzierung, EZM-Synthese und/oder Proliferation
GDF-5, -6, -7	Stimulation der chondrogenen Differenzierung, EZM-Synthese und/oder Proliferation
Wnts	Stimulation der chondrogenen Differenzierung
IGF-1	Stimulation der EZM-Synthese und/oder Proliferation
PDGF, EGF	Stimulation der EZM-Synthese und/oder Proliferation
FGF-2	Stimulation der EZM-Synthese und/oder Proliferation
Noggin, Chordin	Inhibition der Osteogenese / Hypertrophie durch Inhibition des TGF- β / BMP Signalwegs
PTHrP	Inhibition der Osteogenese / Hypertrophie durch Inhibition der terminalen Differenzierung
IHH, SHH, DHH	Inhibition der Osteogenese / Hypertrophie durch Inhibition der terminalen Differenzierung
Matrixkomponenten	
Typ II Kollagen	Stimulation der EZM-Synthese
COMP	Stimulation der EZM-Synthese
Intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle	
SMAD-4, -5	Stimulation der chondrogenen Differenzierung
SMAD-6, -7	Inhibition der Osteogenese / Hypertrophie
Intrazelluläre Transkriptionsfaktoren	
Sox9, -5, -6	Stimulation der chondrogenen Differenzierung
Brachyury	Stimulation der chondrogenen Differenzierung

Nach der erfolgreichen Aufreinigung wurde entdeckt, dass diese Proteinspezies mehrere Proteine umfasste: BMP-1, -2, -3 und -4. In weiteren Untersuchungen wurden zusätzlich BMP-5, -6 und -7 identifiziert.

BMP-2 bis -7 zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu TGF- β und werden als Mitglieder der TGF- β Superfamilie bezeichnet [84]. während BMP-1 als extrazelluläre Metalloproteinase die Aktivierung einiger TGF- β Superfamilienmitglieder vermittelt [86]. In 2009 fassten Axelrad und Einhorn zusammen, dass 17 BMPs isoliert und charakterisiert wurden [86]. Erst die Verfügbarkeit als rekombinantes Protein, ermöglichte die genaue Untersuchung von BMP-2 und seiner Effekte [84]. Die osteogene Wirkung von BMP-2 wurde unter zahlreichen Bedingungen untersucht: Verschiedene Zelltypen, in-vitro und in-vivo Bedingungen, Applikation als rekombinantes Protein oder als *BMP2* Gentransfer [87-90]. Rekombinantes BMP-2 ist, in Kombination mit einer Typ I Kollagen Matrix, als Knochensubstitut (InFUSE™ Bone Graft, Medtronic Sofamor Danek, Memphis, Tennessee, USA) zur Augmentation der Wirbelkörperperfusion mittels eines Cages zugelassen [91]. Ebenso wurden Studien zur Erforschung der chondrogenen Wirkung von BMP-2 unternommen, welche in-vitro [92-124] und in-vivo [125-152] vielversprechende Ergebnisse zeigten.

BMPs induzieren die N-Cadherin vermittelte Zellkondensation, die chondrogene Differenzierung und die Einleitung der hypertrophen Differenzierung, sowie die Proliferation der Epiphysenfugenzellen [31]. Unterschiedliche Ausprägungen der BMP-Effekte in Abhängigkeit vom BMP-Rezeptortyp und der Interaktion der unterschiedlichen Rezeptoren werden diskutiert [31]. BMP-Bindung führt zu einer Formation von BMP Typ I [BMPI] und II Rezeptoren [BMPII]. Es sind drei Typ I Rezeptoren bekannt. Während BMP-Rezeptor IA [BMPIA] und BMP-Rezeptor IB [BMPIB] jeweils die chondrogene Differenzierung vermitteln, scheint der dritte Rezeptorentyp, die Activin-like Kinase 2 [ALK-2], isoliert keinen oder einen inhibitorischen Effekt zu haben. Jedoch ist ALK-2 bei Co-Aktivität synergistisch mit BMPIA und

BMPRII [31]. Nach Formation des Rezeptorkomplexes phosphoryliert BMPRII Serin- und Threoninseitenketten des BMPRI. In der Folge werden durch Phosphorylierung der SMAD- und / oder der p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase [p38 MAPK] Signalweg aktiviert, über welche die Genexpression beeinflusst werden [31]. Die ALK-2 Aktivierung fördert die Expression von Parathyroid hormone-related protein [PTHrP, kodiert von *PTHrP*] [31], dessen Rolle zur Inhibition der hypertrophen Differenzierung im Folgenden dargelegt wird. Eine schematische Darstellung des BMP-Signalweges erfolgt in Abbildung 1-2.

1.5.3. Inhibition der hypertrophen Differenzierung

Die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten gleicht den Vorgängen in der Epiphysenfuge, die in Kapitel 1.2 erläutert sind. Die hypertrophe Differenzierung wird durch Mitglieder der TGF- β Superfamilie [122] gefördert, während IHH über PTHrP diese verzögern [154]. Entsprechend kann die Dämpfung der hypertrophen Differenzierung durch Inhibition der TGF- β -Signalwege oder durch Förderung der PTHrP Wirkung erfolgen.

Die Inhibition von Molekülen der TGF- β Superfamilie kann durch Noggin und Chordin vor Aktivierung der Zellmembranrezeptoren geschehen [155]. Zur Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion sind Verfahren der RNA Interferenz denkbar [29]. Die Induktion der chondrogenen Differenzierung muss dann über alternative Pfade erfolgen [29].

Die Aktivierung der IHH/PTHrP-Signalwege kann durch *IHH* oder PTHrP-Gentransfer oder die Gabe rekombinanter Proteine erfolgen. IHH und PTHrP werden im Folgenden näher erläutert. Die Gen-Kandidaten zur Inhibition der hypertrophen Differenzierung sind ebenfalls in Tabelle 1-8 zusammengefasst.

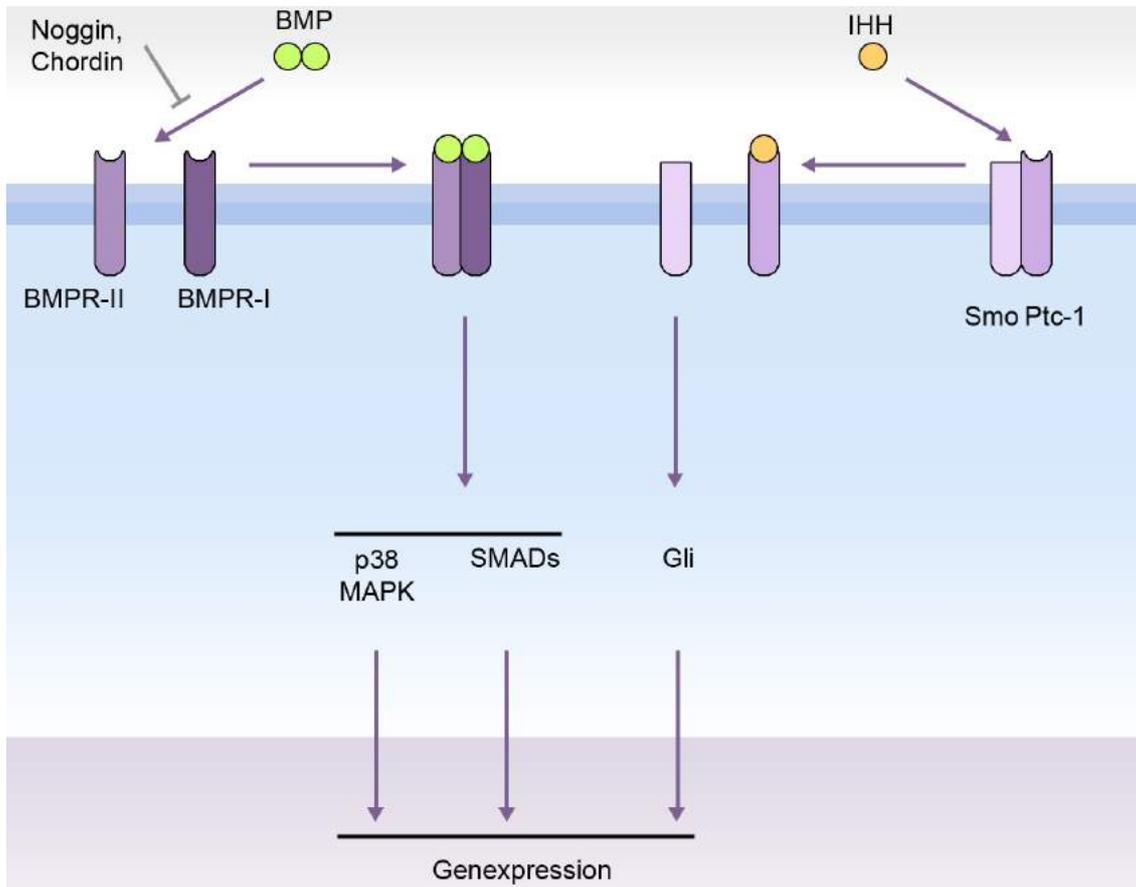


Abbildung 1-2 BMP- und IHH Signalweg [modifiziert nach 153]. Im linken Bildabschnitt ist der BMP-2 Signalweg schematisch dargestellt. Die Bindung von BMP erzeugt Komplexe aus BMP Rezeptor Typ I [BMPR-I] und Typ II [BMPR-II]. Der BMPR-II phosphoryliert Serin- und Threoninseitenketten des BMPR-I. Durch weitere Phosphorylierung wird über SMAD und / oder p38 MAPK Signalwege auf die Genexpression Einfluss genommen. Auf der rechten Bildseite erfolgt die Darstellung des IHH-Signalweges. Unter Abwesenheit von IHH ist der Rezeptor Patched-1 [Ptc-1] an das Membranprotein Smoothened [Smo] gebunden, welches dadurch inaktiviert ist. Nach IHH-Bindung an Ptc-1 löst sich dieser und Smo wird aktiv. Konsekutiv werden Gli-Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche die Genexpression beeinflussen.

1.5.4. IHH und PTHrP

Das Gen *IHH* codiert für das IHH-Protein, welches gemeinsam mit Sonic hedgehog [SHH] und Desert Hedgehog [DHH] ein Mitglied der Hedgehog Familie, einer Gruppe sekretierter Wachstumsfaktoren, ist [156]. IHH wird von

prähypertrophen und frühen hypertrophen Chondrozyten der Epiphysenfuge sekretiert. Gemeinsam mit PTHrP wird über einen negativen Feedback-Mechanismus die Länge der Proliferationszone und somit die Länge der Epiphysenfuge bestimmt [157].

Treten die Chondrozyten der Proliferationszone in die Phase der Hypertrophie ein, schütten diese IHH aus. IHH bindet an membranständige Patched-1 Rezeptoren [Ptc-1], mit konsekutiver Aktivierung des Membranproteins Smoothened [Smo] [157] und Anstieg der intrazellulären Konzentration der Gli Transkriptionsfaktoren-Familie [Gli]. Gli vermitteln die Transkription der Zielgene des IHH Signalweges [31]. Wirkt IHH ohne den Einfluss von PTHrP, wie Studien an Maus-Embryonen mit homozygotem *Pthlh* knockdown zeigten, fördert IHH die hypertrophe Differenzierung [158]. Des Weiteren wird die perichondrale Osteogenese gefördert. Insbesondere an den Enden der entstehenden Knochen werden durch IHH-Stimulation über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus hohe Mengen PTHrP produziert. Die PTHrP Konzentration nimmt in Form eines Gradienten über der Epiphysenfuge ab. Über den G-Protein gekoppelten Parathormon / PTHrP-Rezeptor [PPR] entfaltet das PTHrP seine antihypertrophe Wirkung, fördert die Chondrozytenproliferation und hemmt im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus die IHH-Sekretion. Wird eine gewisse Konzentration unterschritten, wie etwa am Übergang zur hypertrophen Zone der Epiphysenfuge, gehen die Chondrozyten in ein prähypertrophes Stadium ein und sekretieren IHH [157]. Abbildung 1-2 zeigt schematisch den IHH-Signalweg, während Abbildung 1-3 die regulatorischen Vorgänge an der Epiphysenfuge zeigt.

In-vitro führte IHH zur chondrogenen Differenzierung von BMSCs, die jedoch auch Zeichen der hypertrophen Differenzierung aufwiesen [159]. Inwieweit sich der Grad der Hypertrophie nach, durch IHH stimulierter Chondrogenese, von der Hypertrophie nach Stimulation mit einem Mitglied der TGF- β Superfamilie, beispielsweise BMP-2, unterscheidet, ist nicht bekannt.

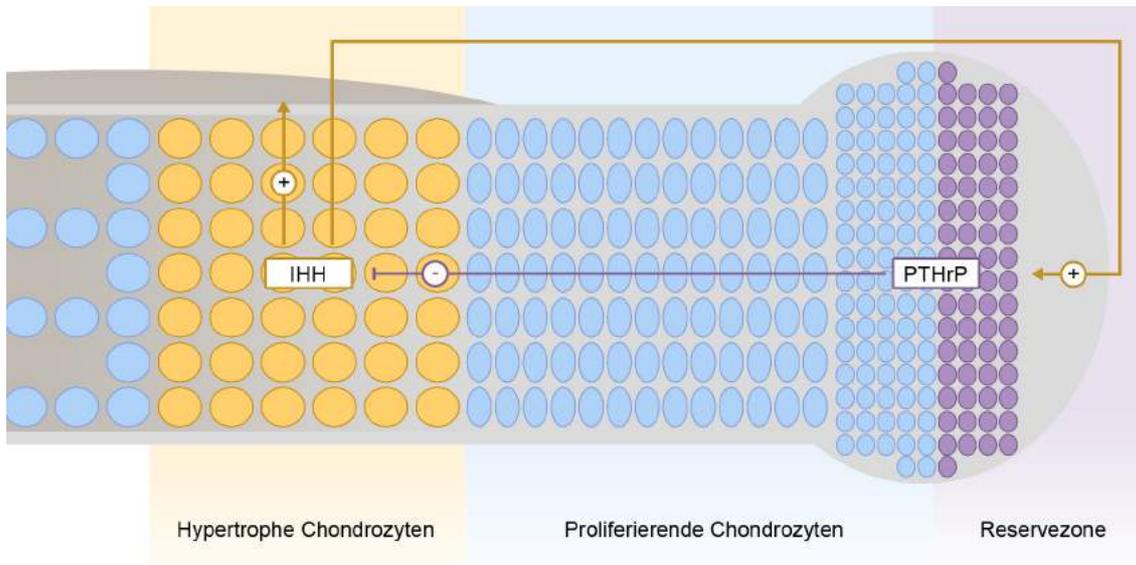


Abbildung 1-3 Regulation der Epiphysenfuge durch IHH und PTHrP in einem negativen Feedback-Mechanismus [modifiziert nach 157]. Prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten sekretieren IHH. Dieses fördert unter Abwesenheit von PTHrP die weitere Hypertrophie der Chondrozyten und die perichondrale Osteogenese. Über einen bislang ungeklärten Mechanismus stimuliert IHH insbesondere in den gelenknahen Zellen die PTHrP Sekretion. Dieses hemmt die Hypertrophie der Chondrozyten, fördert deren Proliferation und reduziert die IHH Sekretion. Die PTHrP Konzentration nimmt in Form eines Gradienten über der Epiphysenfuge in Richtung der gelenkfernen Zonen ab. Ist die PTHrP Konzentration ausreichend stark abgefallen, treten die Chondrozyten der Proliferationszone in ein prähypertrophes Stadium ein und sekretieren IHH.

1.5.5. Vektoren

Um die Expression eines spezifischen Gens zu erreichen, muss dieses mittels eines Vektors in den Zellkern einer Zielzelle gebracht werden. Vektoren werden im Allgemeinen in virale und nicht-virale Vektoren unterschieden [80]. Ausgehend vom Wildtyp, werden Pathogenitäts- und Replikationsgene gelöscht und das designierte Transgen hinzugefügt. Die Vermehrung der viralen Vektoren ist in Zelllinien möglich, welche die gelöschten Genomanteile für Replikation und Verpackung tragen [80]. Virale Vektoren unterscheiden sich bezüglich der Art ihres Genoms, der Transgen-Kapazität, Immunogenität, Zelltropismus und bezüglich der Frequenz der Transgen-Integrierung in das

Genom der Zielzelle [80]. In gentherapeutischen Studien werden hauptsächlich folgende fünf Typen als virale Vektoren eingesetzt: Retrovirus, Lentivirus, Herpes simplex virus-1 [HSV-1], Adenovirus und Adenovirus-assoziiertes Vektor [AAV] [80]. Tabelle 1-9 fasst die Charakteristiken dieser Vektortypen zusammen.

Tabelle 1-9 In klinischen Gentherapie-Studien eingesetzte virale Vektoren [modifiziert nach 80]

Vektor	Genom	Kapazität	Tropismus	Immunogenität	Hauptvorteile und Limitationen
Integrierende Vektoren					
Retrovirus	RNA	8 kb	Teilende Zellen	Niedrig	- Limitiert auf mitotische Zellen - Mögliche Onkogenität + Persistierender Gentransfer
Lentivirus	RNA	8 kb	Breit	Niedrig	- Mögliche Onkogenität + Persistierender Gentransfer
Nicht-integrierende Vektoren					
HSV-1	dsDNA	40 kb	Neurotrop	Hoch	- Starke Inflammation + Hohe Transgenkapazität + Starker Neurotropismus
AAV	ssDNA	< 5 kb	Breit	Niedrig	- Geringe Transgenkapazität + Geringe Inflammation + Apathogener Wildtyp
Adenovirus	dsDNA	8 kb	Breit	Hoch	- Kapsid-vermittelte Inflammation + Effiziente Transduktion

Retrovirale und lentivirale Vektoren tragen RNA und sind befähigt das Vektoren-genom in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Sie werden als integrierende Vektoren bezeichnet [80]. Integrierende Vektoren könnten in manchen Anwendungen eine Onkogenese induzieren [80]. Der Hauptunterschied zwischen beiden integrierenden Vektoren ist die Befähigung des lentiviralen Vektors nicht-teilende Zellen zu transduzieren [80]. Die nicht-integrierenden Vektoren HSV-1, adenovirale Vektoren und AAVs, sind durch episomalen Gentransfer gekennzeichnet [80]. Durch seinen starken Tropismus

für neuronale Zellen, ist HSV-1 weniger für die muskuloskelettale Gentherapie geeignet. Adenovirale Vektoren und AAV zeichnen sich hingegen durch Ihre Fähigkeit aus, verschiedenste Zelltypen zu transduzieren. Die Transduktion mit adenoviralen Vektoren ist sehr effektiv, jedoch häufig von einer starken Immunreaktion begleitet [80]. Aufgrund dieser, ist die intraartikuläre Nachinjektion mit Adenoviren praktisch unmöglich [77]. AAV ist kaum immunogen aber durch eine kleine Transgenkapazität limitiert [80].

1.5.6. Gentransfer Systeme

Für intraartikulären Gentransfer stehen lokalisierte und generalisierte Verfahren zur Verfügung. Beide Verfahren können die in-vivo Transduktion (Transfer von vitalen Vektoren) oder die ex-vivo Transduktion (Transfer von transgenen Zellen) beinhalten.

Generalisierte in-vivo Verfahren umfassen die direkte Applikation von vitalen Vektoren in den Gelenkspalt. Hierdurch werden insbesondere die Zellen der Synovialmembran transduziert, welche das Genprodukt in therapeutischer Konzentration in die Gelenkflüssigkeit sekretieren. Da auf diese Weise alle intraartikulären Gewebe stimuliert werden, können anabole Wachstumsfaktoren durch Fibrosierung der Gelenkkapsel zur Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit und durch Wirkung auf den Knochen zur Osteophytenformation führen [130, 160]. Gelse zeigte, dass letztere verringert werden konnte, wenn anstelle der direkten Vektorapplikation, ex-vivo transduzierte Zellen injiziert wurden. Dieses Gentransferverfahren ist als *generalisiertes ex-vivo Verfahren* zu bezeichnen [130]. Dennoch scheinen generalisierte Verfahren inkompatibel für den Einsatz bestimmter anaboler Wachstumsfaktoren zu sein [82].

In *lokalisierten in-vivo Verfahren* ermöglicht der Einsatz einer Matrix oder eines Tissue-Engineering Konstrukts, die Vektoren einzuschließen und ihre Verbreitung zu kontrollieren. In *lokalisierten ex-vivo Verfahren* wird das transplantierte Konstrukt zuvor mit transgenen Zellen besiedelt [161]. “Ex-vivo Verfahren sind im Allgemeinen invasiver, teurer und technisch anspruchsvoller. Jedoch ermöglichen sie die Kontrolle der transduzierten Zellen und die Sicherheitstestung vor der Transplantation. In-vivo Verfahren sind einfacher, günstiger und weniger invasiv, aber Viren werden direkt in den Körper eingeführt, wodurch die Sicherheit limitiert ist“ [82 Übersetzung Jakob Sieker].

Zusammenfassend können Gentransfersysteme bezüglich des Transgenes, der Vektoren, der Zellen, dem Grad der Lokalisierung und der verwendeten Matrix variieren. Die Kombinationsmöglichkeiten reichen von zeit- und kostensparenden bis zu ressourcenintensiven Verfahren. Abbildung 1-4 illustriert diese Bandbreite anhand von Beispielen lokalisierter Gentherapieverfahren zur Heilung von Gelenkknorpelläsionen. Die Implantation einer vektortragenden Matrix als *lokalisiertes in-vivo Verfahren*, stellt ein Beispiel für ein ressourcensparendes, einzeitiges Vorgehen dar. Ressourcenintensive Verfahren beinhalten die Zellentnahme, Expansion in Zellkultur, ex-vivo Transduktion, Selektion, Besiedelung einer Matrix mit transgenen Zellen und die Transplantation des Tissue-Engineering Konstrukts. Die ressourcenintensiven Verfahren beinhalten somit neben der aufwendigen Laborphase meist ein zweizeitiges operatives Verfahren. Um Zeit- und Kosteneffizienz zu erreichen, wurden Strategien für verkürzte Verfahren des gentherapeutisch-optimierten Tissue-Engineering entwickelt [75]. Ein solches Verfahren ist die Transplantation autologer gentherapeutisch-optimierter Knochenmarkkoagulate, welche im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.

1. Einleitung

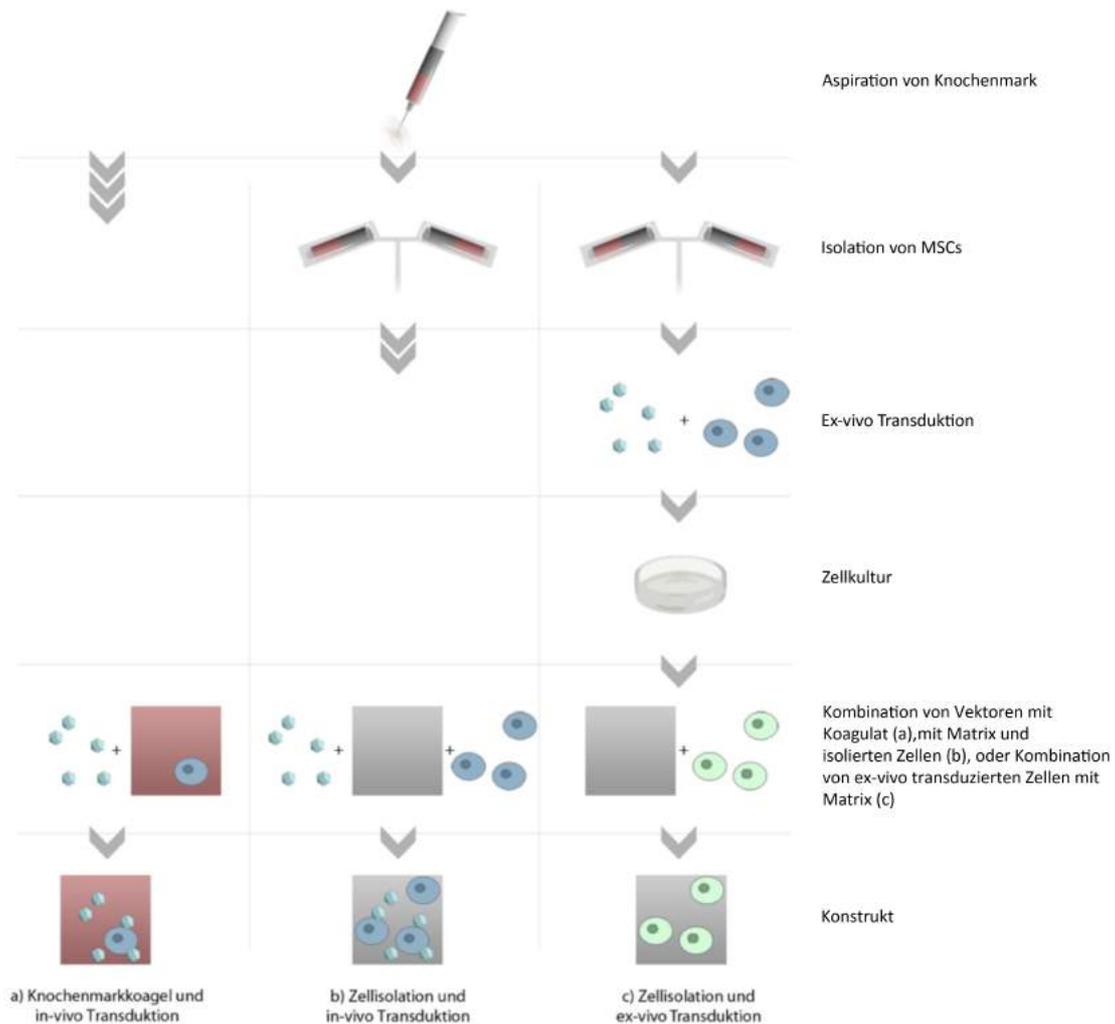


Abbildung 1-4 Lokale Gentransfer Verfahren zur Heilung von Gelenkknorpelläsionen [modifiziert nach 82]

1.5.7. Gentherapeutisch optimierte Knochenmarkkoagulate als Gentransfersystem

Gentherapeutisch optimierte Knochenmarkkoagulate als Gentransfersystem zur Behandlung von Gelenkknorpelläsionen umfassen die Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm und die Addition einer Vektorlösung. Nach Koagulation entsteht ein Konstrukt, das BMSCs, Vektoren, sowie eine autologe Matrix vereinigt und in osteochondrale Läsion transplantiert werden kann [75]. Das Verfahren wurde von Pascher *et al.* 2004

durch adenoviralen Transfer von Markergenen in-vitro und in-vivo charakterisiert. Eingesetzt wurden Grün-fluoreszierendes Protein [GFP, kodiert von *GFP*], firefly luciferase und β -Galactosidase. Die Koagulate wurden entweder in Kultur oder nach Transplantation in osteochondrale Defekte der Femurkondylen von New Zealand White Rabbits [NZWRs] untersucht [75]. Tabelle 1-10 fasst Vor- und Nachteile des Gentransfersystems zusammen, die im Folgenden erläutert werden.

Die Zellentnahme durch Knochenmarkaspiration und Implantation kann bei dem beschriebenen Verfahren in einer einzigen Operation durchgeführt werden. Die Ansprüche eines ex-vivo Verfahrens an Laborinfrastruktur, Zeit und deren Kosten entfallen [75]. Das Knochenmarkkoagulat bietet eine Matrix aus Fibrin, die nativ zum Hostgewebe und vollständig biodegradierbar ist. Sie ist ausreichend robust und adhärent um durch „press fit“ [deutsch Presspassung] in osteochondrale Defekte implantiert zu werden. Eine weitere Fixation ist nicht nötig [75]. Das Fibrinnetzwerk sorgt für ein gutes Containment des Vektors innerhalb des osteochondralen Defektes. Im Vergleich zu vektorbeladenen Typ II Kollagen-Chondroitin-4-Sulfat-Matrices wurden extraläsional weniger transgene Zellen gefunden. Diese fanden sich ausschließlich in der zum Defekt direkt benachbarten Synovialmembran [75]. Die Infektiosität der adenoviralen Vektoren bleibt während des Koagulationprozesses erhalten. Der Überstand von, nach 10 d post-Koagulation, disaggregierten Koagulaten konnte in HEK-293 Zellen erneut eine Transgenexpression auslösen [75]. Genterapeutisch-optimierte Knochenmarkkoagulate ermöglichen die in-vivo Transgenexpression. Transgenexpression konnte 7 d nach Implantation durch Kultur explantierter Koagulate gezeigt werden [75].

1. Einleitung

Tabelle 1-10 Vorteile und Limitationen von gentherapeutisch-optimierten Knochenmarkkoageln als Gentransfersystem zur Therapie von Gelenkknorpelläsionen [vgl. 76]

Charakteristikum	Beschreibung
Vorteile	
Ressourcensparend	Einzeitiges operatives Vorgehen, keine Expansion in Zellkultur erforderlich
Autologe Matrix	Fibrinnetzwerk des Koagulates bietet autologe, biodegradierbare Matrix
Gutes Containment	Leckage der Vektoren aus dem Fibrinnetzwerk des Koagulates ist seltener als Leckage aus transplantierten Typ II Kollagen-Chondroitin-4-Sulfat-Matrices
Erhaltene Infektiosität	Vektoren bleiben bis zu 10 d nach Implantation infektiös
In-vivo Transgenexpression	Explantate zeigen Transgenexpression 7 d nach Implantation
Limitationen	
Variabilität der Zellzahl	Zellzahl variiert zwischen verschiedenen Knochenmarkaspiraten
Variabilität der Transgenexpression	Level der Transgenexpression variiert zwischen verschiedenen Aspiraten und Tieren, Koagulate eines Aspirates zeigen vergleichbare Transgenexpression

Die Menge der implantierten Zellen ist abhängig von deren Konzentration im Knochenmarkaspirat. Pascher et al. zeigten, dass eine hohe Variabilität der Zellkonzentration des Aspirates zwischen unterschiedlichen Tieren zu finden ist. Des Weiteren sinkt die Zellkonzentration von der ersten zu den nachfolgenden Aspirationen. Aus der Variabilität der Zellzahl bedingt sich die Variabilität der Transgenexpression. Gemessen als firefly luciferase Aktivität (Relative Lichteinheiten / mg) ist die Transgenexpression um das fünffache erhöht, wenn Koagulate der ersten mit denen der zweiten Aspiration verglichen werden. Zwischen den Versuchstieren wurden Variabilitäten bis zum dreifachen der verglichenen Werte gemessen. Mehrere Koagulate einer Aspiration zeigten vergleichbare Transgenexpressionslevel [75].

1.6. Fragestellung

Trotz der verfügbaren klinischen Therapieverfahren ist die Regeneration hyalinen Gelenkknorpels noch nicht erreicht. Hauptprobleme sind eine insuffiziente chondrogene Differenzierung und die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten mit nachfolgender Osteogenese. Proteine, welche die Differenzierung hinsichtlich dieser Punkte positiv steuern könnten, sind bekannt und umfassen beispielsweise BMP-2 und IHH.

Für die chondrogene Differenzierung in-vivo ist eine Umgebung aus entsprechenden Stimuli, beispielsweise adäquate Konzentrationen an Wachstumsfaktoren, nötig. Mit rekombinanten Proteinen ist dies schwer zu erreichen, vielversprechend scheinen hier gentherapeutische Verfahren. Ein ressourceneffizientes *lokalisiertes in-vivo Verfahren* für den Gentransfer in Gelenkknorpelläsionen wurde von Pascher *et al.* mittels Markergenen beschrieben [75]. Der Nachweis der Effizienz des Verfahrens zur Knorpelregeneration, mittels adäquater Transgene, steht noch aus.

BMP-2 wurde bereits in-vitro und in-vivo als chondrogener Faktor beschrieben. Die Untersuchung der Effektivität unter Benutzung des oben genannten Gentransfersystems wurde noch nicht beschrieben. Als Mitglied der TGF- β Superfamilie ist jedoch von einer begleitenden Induktion der hypertrophen Differenzierung auszugehen.

Sollten in Zukunft die TGF- β Signalwege inhibiert werden, um die hypertrophe Differenzierung zu verhindern, muss die Induktion der chondrogenen Differenzierung über alternative Signalwege erfolgen. In diesem Kontext ist IHH als vielversprechender Kandidat anzusehen. Inwieweit IHH die Chondrogenese in-vivo induzieren kann und wie es die Qualität des Gelenkknorpelreparationsgewebes moduliert, ist nicht bekannt.

Diese experimentelle Arbeit untersucht die Effizienz von gentherapeutisch-optimierten Knochenmarkkoagulaten zur Regeneration von Gelenkknorpelläsionen, unter Benutzung von *BMP2* und *IHH* als Transgene, kontrolliert durch das Markergen *GFP*. Die folgenden Hypothesen wurden geprüft:

H1:

BMP2 bzw. *IHH* Gentransfer resultiert in einer höheren histologischen Qualität des Reparationsgewebes und einer höheren Typ II Kollagen Deposition als Gentransfer des nicht chondrogenen Markergens *GFP*.

H0:

BMP2 bzw. *IHH* Gentransfer erzeugt keine Unterschiede in der histologischen Qualität des Reparationsgewebes und der Typ II Kollagen Deposition als *GFP* Gentransfer.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Das hier beschriebene in-vivo Experiment wurde nach Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken (Würzburg, Deutschland) in dem Versuchstierbereich des Zentrum für Experimentelle und Molekulare Medizin [ZEMM] der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Würzburg, Deutschland) und in den Laboren des Orthopädischen Zentrums für Muskuloskelettale Forschung [OZMF] in der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus (Würzburg, Deutschland) durchgeführt. Prof. C. H. Evans (Harvard Medical School, Boston, USA) stellte die adenoviralen Vektoren freundlicherweise zur Verfügung. Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung des Lehrstuhles für Mathematik VIII (Statistik) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Würzburg, Deutschland) und des Zentrums für klinische und translationale Forschung der Harvard Universität (Harvard CATALYST, The Harvard Clinical and Translational Science Center, Boston, MA, USA).

Zehn weibliche New Zealand White Rabbits [NZWRs] mit (Durchschnittsgewicht 3.11 ± 0.22 kg Standardabweichung; Charles River, Kißlegg, Deutschland) wurden in eine von drei Gruppen randomisiert: $n = 4$ Tiere in die IHH, $n = 3$ Tiere in die BMP-2 und $n = 3$ Tiere in die GFP Kontrollgruppe. Alle Tiere erhielten einen osteochondralen Defekt in beiden ihrer Kniegelenke. In einem einzeitigen Verfahren wurde dieser Defekt durch die Transplantation eines autologen Knochenmarkkoagulates in Kombination mit Adenoviren, welche die cDNA des gruppenspezifischen Transgenes enthielten, gefüllt (Abbildung 2-1, a-d). Entsprechend der Randomisierung wurden beide Knie eines Tieres mit dem gleichen Transgen behandelt. Entsprechend steuerte jedes unabhängige Tier zwei Beobachtungen zu der Analyse hinzu. Ein weiteres Tier wurde zur Darstellung der Morphologie der behandelten osteochondralen Läsion am Tag der operativen Intervention verwendet (Abbildung 2-1, e).

Die Bewertung der histologischen Qualität des Reparaturgewebes wurde mit dem zweiten histologischen Bewertungssystem der ICRS (ICRS II Histologic Scoring System, siehe Kapitel 2.8) und der Morphometrie immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Im speziellen wurde der Parameter „Generelles Assessments“ des ICRS II Histologic Scoring Systems [ICRS II] und die Typ II Kollagen positive Fläche als primäre Outcomes designiert. Zusätzlich wurden die weiteren Parameter des ICRS II, sowie die Deposition von Typ I Kollagen (als Marker für Faserknorpel) und Typ X Kollagen (als Marker hypertropher Chondrocyten) untersucht. Dreizehn Wochen nach der chirurgischen Intervention, einem Zeitpunkt der zuvor als adäquater Zeitpunkt zur Bewertung von langfristigen Knorpelreparaturergebnissen im Kaninchenmodell beschrieben wurde [19], wurden die BMP-2 und IHH behandelten Tiere mit den Tieren der GFP Kontrollgruppe verglichen.

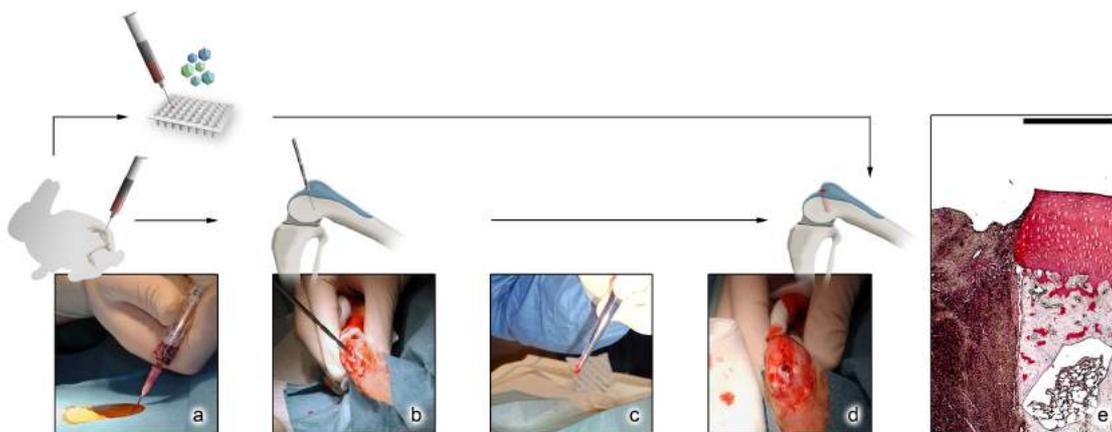


Abbildung 2-1 Genterapeutisch-optimierte Knochenmarkskoagel: Schema der chirurgischen Intervention und Defektmorphologie. Aspiration autologen Knochenmarks, Transfer in eine 96-Well Platte und Addition von 1×10^{11} Plasmid-tragenden Adenoviren (kodierend für *BMP2*, *IHH* oder *GFP*) pro Mulde (a). Freilegen der femoralen Trochlea mittels medialer Arthrotomy und Herstellung eines 3,2 mm durchmessenden osteochondralen Defektes (b). Das Vektor-beladene Knochenmarkskoagulat wurde mittels einer anatomischen Pinzette aus der 96-Well-Platte entnommen und ohne weitere Fixation in den osteochondralen Defekt eingebracht (c,d). Der Verschluss von Kapsel, subkutanen Gewebe und Haut erfolgte schichtweise. Die Intervention wurde am kontralateralen Knie wiederholt. Immunhistochemische Färbung von Typ II Kollagen (rot) des nativen angrenzenden Knorpels unmittelbar nach der Implantation. Nativer Knorpel und subchondraler Knochen sind auf der rechten Bildhälfte abgebildet, während der durch das Koagulat gefüllte osteochondrale Defekt auf der linken Bildhälfte dargestellt ist. Für das histologische Bild war die Demineralisierung der Probe notwendig, welche die Integrität des Koagulats beeinträchtigt haben könnten (e).

2.2. Vektorpräparation

Für diese Studie stellte Prof. C. H. Evans (Harvard Medical School, Boston, USA) die adenoviralen Vektoren freundlicherweise zur Verfügung. Eingesetzt wurden Adenoviren der ersten Generation, Serotyp 5 mit deletierten E1 und E3 Gensegmenten. Als Transgene trugen diese entweder *BMP2*, *IHH* oder *GFP* cDNA. Die Amplifikation der Vektoren erfolgte in den Laboren der biologischen Sicherheitsstufe 2 der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus (Würzburg, Deutschland) in menschlichen embryonalen Nierenzellen der Linie HEK-293 [engl. Human Embryonic Kidney]. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über Caesiumchlorid-Gradienten. Eine Viruskonzentration von 10^{12} bis 10^{13} Viruspartikeln/ml wurde mittels optischer Dichte bei 260 nm und Plaque Assay ermittelt [45, 46]. Vektorlösungen der entsprechenden Konzentration standen als Aliquot bei -80° Celsius zur Verfügung.

2.3. Chirurgische Intervention und Gentransfersystem

Das von Pascher et al. beschriebene Verfahren zur Nutzung gentherapeutisch-optimierter Knochenmarkkoagel für den Gentransfer in Gelenkknorpelläsionen wurde in dieser Studie unter geringen Modifikationen angewendet [75]. Diese beinhalten die Lokalisation des osteochondralen Defektes, sowie die Konzentration der infektiösen Partikel im fertigen Koagulat [75]. Abbildung 2-1 gibt einen schematischen Überblick über die Intervention.

Die Anästhesie wurde durch die Gabe von Lachgas und Isofluran mittels einer Atemmaske erreicht. Begleitend erhielten die NZWRs Tramadol gtt., intramuskuläres Penicillin und Heparin als Prophylaxe von perioperativen Schmerzen, Wundinfekten und thrombembolischen Ereignissen.

Die Aspiration des Knochenmarks erfolgte unmittelbar vor der Arthrotomie in Allgemeinanästhesie. Hierbei wurde etwa 1 ml Aspirat unter der Verwendung steriler Kautelen mittels einer 18 Gauge Kanüle und 5 ml Spritze gewonnen. Für jeden Defekt wurde 200µl autologes Knochenmarkaspirat mit 1×10^{11} Vektoren entsprechender Vektorlösung in einer Mulde einer gewöhnlichen 96-Well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gemischt und durfte während des operativen Eingriffes unter Kontakt mit OP-Luft koagulieren. Die als Formschale fungierende 96-well-Platte ermöglichte nach 15 - 30 min die Gewinnung eines konsolidierten, formbaren Koagulates.

Nach vorsichtiger Entfernung der Haare, gründlicher Desinfektion und Abkleben des Operationsgebietes mit sterilen Tüchern (Raucodrape®, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland) erfolgte die Hautinzision. Nach medialer Arthrotomie konnte die Patella nach lateral evertiert und die Femurtrochlea exponiert werden. Die osteochondralen Defekte wurden mittels eines elektrischen Bohrers mit einem Durchmesser von 3,2 mm generiert. Die Durchbrechung der subchondralen Kompakta wurde sichergestellt. Die angestrebte Defekttiefe betrug 5 mm. Anschließend konnten die autologen gentherapeutisch optimierten Knochenmarkkoagel press-fit in die Defekte eingebracht werden. Eine weitere Fixation war nicht nötig. Die Kapselnaht erfolgte mittels polyfilem, resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl®, Stärke 0; Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland), die Hautnaht mittels Vicryl rapid® (Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) und Sprühpflaster (Hansaplast, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland). Die NZWRs durften sich postoperativ frei in ihrem Stall bewegen. Es wurde ein Tag-Nacht Rhythmus von je 12 Stunden simuliert.

2.4. Euthanasie

Die Euthanasie erfolgte nach 13 Wochen (12 Wochen und 6 ± 4 Tage). Die Anästhesie wurde mittels intramuskulärer Injektion von 0.5 ml Rompun® 2% Injektionslösung (entsprechend 10 mg Xylazin, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 2 ml Ketamin 10% Injektionslösung (entsprechend 200 mg Ketamin, medistar® Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland) eingeleitet. Nach dem Erreichen einer tiefen Anästhesie, erfolgte die Euthanasie durch die Applikation von 3 ml T61 Injektionslösung (entsprechend 15 mg Tetracainhydrochlorid, 150 mg Mebezoniumiodid, 600 mg Embutramid, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany) in die Ohrvene. Nach der Feststellung des Todes wurden die distalen Femurdiaphysen proximal des patellaren Gleitlagers durchtrennt um die distalen Femora zu entnehmen. Nach kompletter Entfernung der Gelenkkapsel wurden die Epikondylen mit einem Meißel abgetragen. Anschließend erfolgte die Immersion in dem im Kapitel 2.5.1. beschriebenen Fixationsmittel.

2.5. Aufbereitung für histochemische Analysen

Die Aufbereitung der distalen Femora für die histochemische Analyse erfolgte nach den Standardprotokollen des Orthopädischen Zentrums für Muskuloskelettale Forschung [OZMF] der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Würzburg Deutschland). Für die Typ I Kollagen, Aggrecan- und CS-4 Immunhistochemie wurden unter Berücksichtigung der Herstellerangaben Protokolle entwickelt. Für die Safranin-O/Fast-green Färbung wurde freundlicherweise ein Protokoll von der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikum Würzburg

(Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die genutzten Protokolle und Chemikalien sind im Folgenden detailliert beschrieben.

2.5.1. Fixation und Demineralisierung

Entsprechend den Empfehlungen des ICRS Histology Endpoint Committees wurde vierprozentige Paraformaldehydelösung [4% PFA] (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Fixationsmittel eingesetzt [19]. Die Proben verblieben über 11 Wochen und 5 Tage (± 3 Wochen und 3 Tage = 1 *SD*) in der Fixationslösung, gefolgt von der Demineralisierung in Calci-Clear Rapid (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) für 8 Wochen und 3 Tage (± 5 Tage = 1 *SD*). Die lange Fixationszeit ist durch die Nutzung der Proben in einer parallelen MRT-Studie begründet. Aktuelle Empfehlungen zur Aufbereitung histologischer Proben können Homann et al. entnommen werden [19].

2.5.2. Paraffineinbettung und Mikrotomschnitte

Durch Immersion in 50%, 70%, 95% und 100% Ethanol (AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) für je 24 h, gefolgt von Ethanol/ n-Amylacetat (1:1) bei 20° C, Ethanol / n-Amylacetat (1:1) bei 60° C und zweimal 100% n-Amylacetat (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) erfolgte bei 60° C für je 12 h die Dehydrierung. Die dehydrierten Proben wurden dann dreimal für je 24 h in Paraffin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei 60° eingelegt, bevor sie als Block eingebettet wurden. Die eingebetteten Proben konnten bei -20° C aufbewahrt und

anschließend mittels Mikrotom 4 µm Schnitte erstellt werden. Diese wurden auf SuperFrost® Plus Menzel-Gläser (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

2.5.3. Entparaffinierung & Rehydrierung

Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurde das Paraffin der Schnitte 60 min bei 60° erwärmt und anschließend durch Xylol (AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) zweimal für je 8 min herausgelöst. Anschließend erfolgte die Rehydrierung durch zweimalige Immersion in 95% Ethanol für je 2 min, gefolgt von 70% und 50% Ethanol für je 5 min. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertes Wasser gegeben.

2.5.4. Hämatoxylin Eosin [HE] Färbung

Die Proben wurden für 9 min in vorgefertigter Hämatoxylinlösung (Zusammensetzung in Tabelle 2-1) gefärbt. Anschließend wurden sie kurz mit destilliertem H₂O gespült, in 0.25% HCl- / 50% Ethanollösung (Zusammensetzung in Tabelle 2-2) für 3 s differenziert, erneut in destilliertem Wasser gespült und anschließend in mineralhaltigem Leitungswasser 10 min gebläut. Anschließend folgte die Färbung durch Eosin (Zusammensetzung in Tabelle 2-3) für 2 min, die Spülung in destilliertem Wasser, sowie die Differenzierung in 70% Ethanol für 3 s. Die gefärbten Proben wurden mit 95% Ethanol für 3 s, zweimal 100% Isopropylalkohol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

2. Material und Methoden

Schnelldorf, Deutschland) und zweimal Xylol für je 5 min dehydriert und mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beschichtet.

Tabelle 2-1 Häkalaunlösung: Zusammensetzung

Bestandteil	Konzentration/Stoffmenge
Hämatoxylin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	6 g
Natriumiodid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1 g
Aluminiumkaliumsulfat	250 g
Chlorhydrat	250 g
Zitronensäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	5 g
Destilliertes Wasser	5 l

Vor Gebrauch wurde die Lösung 4 Wochen offen gelagert

Tabelle 2-2 0.25% HCl- / 50% Ethanol-Lösung: Zusammensetzung

Bestandteil	Konzentration/Stoffmenge
1-molare Salzsäure [HCl] (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	250 µl
100% Ethanol (AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland)	50 ml
Destilliertes Wasser	50 ml

Tabelle 2-3 1% Eosinlösung: Zusammensetzung

Bestandteil	Konzentration/Stoffmenge
Eosin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1g
Destilliertes Wasser	100 ml
Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	1 Tropfen

2.5.5. Alcianblau Färbung

Zum Nachweis der negativ geladenen Carboxy- und Sulfatgruppen der GAGs, wurde die Alcianblau Färbung durchgeführt. Die GAG-Synthese dient als Marker der chondrogenen Differenzierung. Nach 3 min in 3% Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die Färbung in 1% Alcianblau 8 GX bei pH 1,0 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland). Nach kurzer Spülung in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung für 2 min in Kernechtrot (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Nach erneutem Spülen erfolgte die Differenzierung durch 3 s in 70% Ethanol, gefolgt von der Dehydrierung durch 3 s 95% Ethanol, sowie je zweimal 5 min in 100% Isopropylalkohol und Xylol. Zum Eindecken wurde Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.5.6. Safranin-O / Fast-green Färbung

Als weitere Nachweismethode für GAGs wurde Safranin-O, mit einer Gegenfärbung durch Fast-green eingesetzt. Initial erfolgte die Färbung durch Hämatoxylin-Lösung nach Weigert für 6 min, gefolgt von der kurzen Differenzierung in destilliertem Wasser und 0.5% Azid-Alkohol für je 1 s. Die Schnitte wurden für 5 min unter laufendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die Färbung in 0.02% Fast Green für 4 min. Nach dreimaligen Eintauchen in 1% Essigsäure erfolgte die Färbung in 0.1% Safranin-O Lösung für 6 min. Die Dehydrierung erfolgte durch zehnmaliges Eintauchen in 95% Ethanol, 20-maligem Eintauchen in 100% Isopropylalkohol, gefolgt von je 1 min in 100% Isopropylalkohol und Xylol, sowie weiteren 2 min in Xylol. Zum Eindecken wurde Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.5.7. Polarisierende Lichtmikroskopie [PLM]

Die polarisierte Lichtmikroskopie wurde genutzt, um den Organisationsgrad der Kollagenfasern zu bewerten [19]. Verwendet wurden repräsentative HE-gefärbte Schnitte unter Einsatz der entsprechenden Polarisationsfilter des Carl Zeiss Axioskop Mikroskops unter Benutzung eines 10x Objektivs, der AxioCam ICc 1 Kamera und der Axiovision 40 Version 4.7.2.0 Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany).

2.6. Aufbereitung für immunhistochemische Analysen

Zur Detektion von Typ II Kollagen, als Marker für hyalinen Knorpel, Typ I Kollagen, als Marker für Faserknorpel, und Typ X Kollagen, als Marker für hypertrophe Chondrozyten, wurden die in Tabelle 2-4 genannten Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde die Detektion von Chondroitin Sulfat 4 Proteoglykan und Aggrecan als Marker hyalinen Knorpels angestrebt (Tabelle 2-4).

Hierzu wurden die entparaffinierten Schnitte in 0.05 M Trisbase-gepufferter Lösung [0.05 M TBS; engl. Tris-buffered saline] (Zusammensetzung in Tabelle 2-5) rehydriert. Im Anschluss wurde die enzymatische Verdauung gemäß der darzustellenden Epitope durchgeführt (Tabelle 2-4).

Unspezifische Bindungsstellen wurden mittels Blockierungslösung (Zusammensetzung in Tabelle 2-6) blockiert. Nach 20 min wurden die Antikörperlösungen in den jeweiligen Konzentrationen (Tabelle 2-4) hinzugefügt und für 24 h bei Dunkelheit in einer feuchten Kammer inkubiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2-4 Immunhistochemische Färbungen: Zielproteine, verwendete Antikörperkonzentrationen und Probenvorbehandlung

Zielprotein	Antikörper	Konzentration/ Verdünnung	Probenvorbehandlung
Typ II Kollagen (Kollagen alpha-1(II))	Maus IgG1, monoklonal (AF5710, Acris Antibodies, San Diego CA, USA)	2.5 µg/ml	15 Minuten Verdau durch 1 mg/mL Pepsin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) bei Raumtemperatur
Typ I Kollagen (Kollagen alpha-1(I))	Maus IgG1, monoklonal (ab90395, Abcam, Cambridge MA, USA)	1:200	60 Minuten Verdau durch 5 mg/mL Pronase (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) bei 37° C
Typ X Kollagen (Kollagen alpha-1(X))	Maus IgM, monoklonal (C7974, Sigma Aldrich, Saint Louis MO, USA)	10 µg/ml	3 Minuten Verdau durch 0.25% Trypsin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) bei Raumtemperatur
Aggrekan	Kaninchen, polyklonal (AB1031, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA)	5 µg/ml	60 Minuten Verdau durch 1 U/ml Chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) bei 37° C
Chondroitin Sulfat Proteoglykan 4	Maus IgG1, monoklonal (MAB2030, Millipore, Temecula, USA)	1:100	60 Minuten Verdau durch 1 U/ml Chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) bei 37° C

Tabelle 2-5 0.05 M TBS: Zusammensetzung

Bestandteil	Konzentration/Stoffmenge
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland)	6.06 g
Natriumchlorid (AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland)	8.77 g
Bidestilliertes Wasser	1000 ml

Tabelle 2-6 Blockierungslösung: Zusammensetzung

Bestandteil	Konzentration/Stoffmenge
0.05 M TBS	100 ml
Bovines Serumalbumin [BSA] (PAA, Pasching, Österreich)	2 g
Pferdeserum (PAA, Pasching, Österreich)	5 ml

Ungebundene Antikörper wurden durch Spülung mit 0.05 M TBS entfernt. Für die Detektion der Maus-Antikörper wurde das SuperSensitive™ Link-label IHC Detection System (BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA) genutzt. Dieses besteht aus einem biotinyliertem Antikörper gegen Maus-IgG und Maus-IgM [Link] und einer an Streptavidin gekoppelten Alkalische Phosphatase [Label]. Zunächst wurden die Schnitte 20 min mit Link-Lösung (Hergestellt aus den im Kit mitgelieferten Lösungen im Verhältnis 1:100) überschichtet. Die ungebundenen Link-Antikörper wurden durch Spülung mit 0.05 M TBS entfernt. An die verbliebenen Link-Antikörper wurden nun mittels Streptavidin-Biotin-Interaktion die Alkalische Phosphatase, durch 20-minütige Überschichtung mit Label-Lösung (Hergestellt aus den im Kit mitgelieferten Lösungen im Verhältnis 1:100), gebunden. Ungebundene Enzyme wurden durch Spülen mit 0.05 M TBS entfernt. Das Chromogen wurde 1 h zuvor nach den Angaben des Hersteller BioGenex (Fremont, Kalifornien, USA) in den gelieferten Abgabegrößen vorbereitet: Eine Tablette Fast Red (BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA) wurde in einer 5 ml Flasche Naphthol-Trisphosphat (BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA) gelöst und lichtgeschützt bei 7° C aufbewahrt. Nach Zugabe von 3 gtt. 0.001 M Levamisol-Hydrochlorid-Lösung (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) pro 5 ml Fast Red-Lösung zur Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase, folgte die Überschichtung der Schnitte. Nach 15 Minuten wurde die Katalyse des Chromogens durch Spülen in destilliertem Wasser unterbrochen. Die Schnitte wurden 30 s in Hämalunlösung (Zusammensetzung in Tabelle 2-1) gegengefärbt und 30 s in Leitungswasser gebläut. Es folgte nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser die Eindeckung mit Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Pro Objektträger wurden zwischen 125 und 250 µl der Lösungen für eine ausreichende Überschichtung benötigt. Als Negativkontrolle wurde in jeder Charge ein Schnitt mitgeführt, der anstelle des Primär-Antikörpers mit Mausserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gleicher Konzentration behandelt wurde. In Färbungen zum Nachweis hyaliner Marker (Typ II Kollagen, Chondroitin-4-sulfat, Aggrekan) diente der native benachbarte

Gelenkknorpel als Positivkontrolle, während der subchondrale Knochen als Positivkontrolle für den Faserknorpelmarker Typ I Kollagen diente.

2.7. Digitalisierung der histologischen Schnitte

Als repräsentativ wurden Schnitte gewertet, die ausreichend zentral gelegen waren, um mindestens 80% des Defektdurchmessers von 3,2 mm ($\geq 2,56$ mm) abzubilden. Mittels des Carl Zeiss Axioskop Mikroskops unter Benutzung eines 10x Objektivs, der AxioCam ICc 1 Kamera und der Axiovision 40 Version 4.7.2.0 Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) wurden digitale Fotoaufnahmen der mikroskopischen Schnitte in einem rasterartigen Muster angefertigt. Diese wurden mittels der Photomerge-Funktion von Adobe Photoshop CS5 Extended Version 12.0.4 (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA) zusammengefügt. Dabei wurden jegliche Skalierungen, Rotationen oder sonstige Änderungen der originalen Bilddaten untersagt. Jedes zusammengesetzte Bild wurde wenn erforderlich manuell korrigiert. In der anschließenden Bewertung bestand die Möglichkeit, jeden digitalisierten Schnitt in der Übersicht zu betrachten und bei Bedarf stufenlos wichtige Details zu vergrößern.

2.8. Histologische Analyse: ICRS II Histology Scoring System

Zur semiquantitativen Bewertung der Qualität des Reparaturgewebes nach Therapie der Gelenkknorpelläsion, stehen eine Vielzahl von Auswertungssystemen zur Verfügung. Aufgrund der eingeschränkten Reliabilität dieser Punktesysteme, entwickelten Mainil-Varlet et al. ein neues Scoring-System:

das ICRS II Histological Scoring System [ICRS II] [163]. Dieses beinhaltet 14 Parameter, denen eine Bedeutung für die physiologische Langzeit-Funktionalität von Gelenkknorpel zugeschrieben wird [163]. Den Parametern werden auf einer Visuellen Analog Skala [VAS] ein Wert zwischen 0 und 100 zugeordnet. Ein Wert von 100 entspricht einer optimalen Gelenkknorpelregeneration, während ein Wert von 0 das schlechtmöglichste Reparationsergebnis beschreibt. Die Nutzung einer VAS soll als diskriminativeres Verfahren mehr Unterschiede zwischen den Parametern zeigen, als die bisherigen ordinalskalierten Verfahren [163]. Innerhalb der Erstpublikation wurde eine höhere Korrelation zwischen den Bewertern des ICRS II gegenüber anderen populären Auswertungssystemen gezeigt [163]. Tabelle 2-7 zeigt die 14 Parameter mitsamt den Ankerpunkten für die Werte 0 und 100. Die Auswertung der Schnitte wurde in dieser Studie durch drei verblindete, unabhängige Bewerter anhand der digitalisierten histologischen Schnitte durchgeführt. Vor der Auswertung wurden die Bewerter anhand des Bildmaterials der ICRS II Erstpublikation geschult [163]. Die vergebenen Punktzahlen der einzelnen Bewerter wurden als arithmetische Mittel für jeden Defekt zusammengefasst, die arithmetischen Mittel der Studienarme gebildet und die Korrelation zwischen den Bewertern erfasst. Die statistischen Methoden sind in Kapitel 2.10. beschrieben.

Tabelle 2-7: ICRS II Histological Scoring System [ICRS II] [163 Übersetzung Jakob Sieker]

Parameter	Anteil der VAS
1. Gewebemorphologie (unter polarisiertem Licht)	
Normale Doppelbrechung des Knorpels	100%
Kollagenfasern über die gesamte Tiefe des Regeneratgewebes	0%
2. Färbbarkeit der Matrix (Metachromasie)	
Volle Metachromasie	100%
Keine Anfärbbarkeit	0%

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 2-7: ICRS II Histological Scoring System [ICRS II] [163 Übersetzung Jakob Sieker]

Parameter	Anteil der VAS
3. Zelluläre Morphologie	
Überwiegend runde / ovale Zellen	100%
Keine runde / ovale Zellen	0%
4. Chondrozytäres Clustering (Vier oder mehr gruppierte Zellen)	
Fehlend	100%
Vorhanden	0%
5. Oberflächenarchitektur	
Glatte Oberfläche	100%
Ablösung oder schwerwiegende Unregelmäßigkeiten	0%
6. Basale Integration	
Komplette Integration	100%
Keine Integration	0%
7. Formation der Tidemark	
Vollständige Tidemark	100%
Keine Kalzifikationsfront	0%
8. Abnormitäten des subchondralen Knochens / Markraumfibrose	
Normaler Markraum	100%
Abnormal	0%
9. Inflammation	
Fehlend	100%
Vorhanden	0%
10. Abnormale Kalzifikation / Ossifikation	
Fehlend	100%
Vorhanden	0%
11. Vaskularisierung des Reparationsgewebes	
Fehlend	100%
Vorhanden	0%

Fortsetzung Tabelle 2-7: ICRS II Histological Scoring System [ICRS II] [163 Übersetzung Jakob Sieker]

Parameter	Anteil der VAS
12. Assessment der Oberfläche und superfiziellen Zone	
Darstellung von intaktem Gelenkknorpel	100%
Totaler Verlust oder komplette Unterbrechung	0%
13. Assessment der mittleren und tiefen Zone	
Normaler hyaliner Knorpel	100%
Faseriges Bindegewebe	0%
14. Generelles Assessment	
Gut: hyaliner Knorpel	100%
Schlecht: Faserknorpel	0%

2.9. Typ II Kollagen Histomorphometrie

Mit der Histomorphometrie wurde der Anteil des biochemisch hochwertigen Reparationsgewebes innerhalb der präinterventionellen Knorpelzone beurteilt. Eine hohe biochemische Qualität wurde durch die immunhistochemische Anfärbung von Typ II Kollagen angezeigt. Die Histomorphometrie wurde mittels Adobe Photoshop CS5 Extended Version 12.0.4 (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA) durchgeführt. Zunächst wurde eine Vorgehensweise definiert, die in Tabelle 2-8 dargestellt ist und im Folgenden beschrieben wird. Die beste Schätzung der präinterventionellen Knorpelfläche wurde definiert und als „chondrale Defektfläche“ bezeichnet. Um die beste Schätzung der chondralen Defektfläche zu erhalten wurden mittels Bézierkurven Projektionen der nativen Knorpeloberfläche und der subchondralen Lamelle erstellt. Die lateralen Begrenzungen wurden senkrecht zur subchondralen Lamelle definiert. Innerhalb der so definierten chondralen Defektzone wurde nun manuell und unverblindet durch JS die Fläche intensiver immunhistochemischer Typ II

Kollagen Färbung festgelegt und als „*Typ II Kollagen positive Fläche*“ bezeichnet. Die Ergebnisse der Histomorphometrie wurden als „*Typ II Kollagen positive Fläche %*“ angegeben und wie folgt berechnet:

$$(Typ\ II\ Kollagen\ positive\ Fläche / chondrale\ Defektfläche) \times 100$$

Die statistische Analyse ist in Kapitel 2.10. beschrieben. Der native benachbarte Gelenkknorpel diente als Referenz.

Tabelle 2-8 Vorgehensweise der Typ II Kollagen Histomorphometrie: erstellt für Adobe Photoshop CS5 Extended für Mac, Version 12.0.4 (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA)

Ziel	Einzelsschritte
Erstellung der besten Schätzung der „chondralen Defektfläche“	<ul style="list-style-type: none"> - Erstellung einer neue Ebene (Ebene/Neu/Ebene). - Markierung der defektnächsten Punkte der nativen Oberfläche (a und a') und der nativen subchondralen Kompakta (b und b'). - Messung der Defektgröße (Distanz zwischen den korrespondierenden Punkten a und a', sowie b und b'). - Markierung der Punkte der nativen Oberfläche die 1/3 der Defektgröße vom korrespondierenden Punkt a, a', b und b' entfernt liegen. Bezeichnung dieser Punkte als A, A', B und B'. - Zeichnen einer Geraden mit Länge der Defektgröße mittels des Linealwerkzeuges (Analyse/Linealwerkzeug) ausgehend vom Punkt A durch a, A' durch a', B durch b, bzw. B' durch b'. Markierung der Enden der jeweiligen Geraden mit AA, A'A', BB bzw. B'B - Auswahl des Zeichenstift-Werkzeuges, Linksklick auf Punkt a, Halten der linken Maustaste und Bewegung des Cursors über eine kurze Strecke, bis ein Einstellhebel aus dem neu erstellten Pfadpunkt entstehen. Auf gleiche Weise verbinden der Punkte a', b' und b und schließen des Pfades durch klicken in den ersten Pfadpunkt. - Halten der cmd-Taste und Auswahl des Pfadpunktes über a. Halten der cmd-Taste und bewegen des defektfernen Einstellhebeldes in den Punkt A, sowie des defektnahe Endes in den Punkt AA. Anwenden des gleichen Verfahren bei den Punkten a', b und b'. - Abschließend beinhaltet der Pfad die „chondrale Defektfläche“, die obere Kontur ergibt eine gute Schätzung der nativen Knorpeloberfläche, während die untere Kontur eine gute Schätzung der subchondralen Kompakta darstellt.
Messung der „chondralen Defektfläche“	<ul style="list-style-type: none"> - Erstellung einer neuen Ebene (Ebene/Neu/Ebene). - Halten der cmd-Taste und Auswahl des Pfades durch Linksklick auf diesen. Öffnen des Auswahlménüs mittels Rechtsklick auf den Pfad, „Auswahl erstellen/OK“. - Anfärbung der Auswahlfläche mittels des Füllwerkzeugs in einer transparenten Farbe. - Auswahl des Polygon-Lasso-Werkzeugs und Entfernen der Ebenenanteile lateral der Defektgrenze (Verbindung von a und b, bzw. a' und b'). - Deselektion der Auswahl (Gleichzeitiger Druck der cmd- und D-Taste) - Auswahl der eingefärbten „chondralen Defektfläche“ mittels des Zauberstab-Werkzeuges. - Größenmessung der chondralen Defektfläche mittels der Analysefunktion (Analyse/Messungen aufzeichnen).

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 2-8 Vorgehensweise der Typ II Kollagen Histomorphometrie: erstellt für Adobe Photoshop CS5 Extended für Mac, Version 12.0.4 (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA)

Messung der „Typ II Kollagen positiven Fläche“	<ul style="list-style-type: none">- Erstellung einer neuen Ebene (Ebene/Neu/Ebene).- Auswahl derjenigen Anteile des Reparationsgewebes mit Hilfe des Lasso-Werkzeuges (Halten der cmd-Taste zur Mehrfachauswahl), deren Typ II Kollagen Färbungsintensität der des nativen benachbarten Knorpels entspricht (Plausibilitätsprüfung: Ist der native Knorpel ausreichen angefärbt?)- Färbung der Auswahlfläche mittels des Füllwerkzeugs in einer weiteren transparenten Farbe.- Deselektion der Auswahl (Gleichzeitiger Druck der cmd- und D-Taste)- Auswahl der eingefärbten „chondrale Defektfläche“ mittels des Zauberstab-Werkzeuges.- Öffnen des Auswahlmenüs mittels Rechtsklick in die markierte Fläche und Auswählen von „Auswahl umkehren“.- Auswählen der „Typ II Kollagen positiven Fläche“-Ebene in der Ebenenauswahl und Entfernung der in der jetzigen Auswahl liegenden Ebenenanteile (Löschen-Taste).- Auswahl der eingefärbten „Type II Kollagen positive Area“ Fläche mittels des Zauberstab-Werkzeuges- Messung der Größe der „Type II Kollagen positive Area“ mittels der Analyse Funktion (Analyse/Messungen aufzeichnen). Der oberste, neuerstellte Wert im Analyseprotokoll entspricht der Summation aller Typ II Kollagen positiven Einzelflächen und somit der „Typ II Kollagen positiven Fläche“.
Berechnung der „Typ II Kollagen positiven Fläche %“	<ul style="list-style-type: none">- Der Quotient aus den Messwerten der „Typ II Kollagen positiven Fläche“ und der „chondralen Defektfläche“ x 100 entspricht der „Typ II Kollagen positiven Fläche %“

2.10. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden beschrieben, ihre Reliabilität geprüft, die Gruppenunterschiede ermittelt und auf statistische Signifikanz geprüft. In der finalen Bewertung der Daten wurden Reliabilität, Effektgröße und statistische Signifikanz berücksichtigt.

2.10.1. Reliabilität

Bezüglich der ICRS II Parameter, welche durch mehrere Untersucher bewertet wurden, wurde mittels Microsoft® Excel® für Mac 2011 Version 14.0.2 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) das arithmetische Mittel

gebildet und für die weitere Analyse verwendet. Die Korrelation zwischen den Untersuchern wurde mit IBM SPSS Statistics Version 19 (SPSS Inc., IBM, Armonk, New York, USA) getestet und wird anhand des Pearsons Korrelationskoeffizienten dargestellt. In die Bewertung der Reliabilität wurden neben den 13 Wochen Proben dieses Experimentes zusätzlich Gelenke eingeschlossen, die bereits 8 Wochen nach identischer Intervention analysiert wurden (Gesamtzahl von 34 Gelenken). Pearson's $r > 0.6$ wurde als hohe Korrelation, $r > 0.5$ als moderate Korrelation und $r < 0.5$ als niedrige Korrelation bezeichnet.

2.10.2. Deskriptive Statistik

Die arithmetischen Mittel der jeweiligen Gruppen und die korrespondierenden 95% Konfidenzintervalle [95% CI] wurden mittels eines gemischten linearen Modells ermittelt. Gemischte Modelle beziehen eine mögliche Korrelation zwischen den beiden Beobachtung innerhalb eines Tieres (linkes und rechtes Knie) in den Test ein. Hierzu wurde die „proc mixed“ Funktion der SAS Software (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet.

2.10.3. Signifikanztest

Für die Errechnung von Gruppenunterschieden und zum Test der statistischen Signifikanz wurde ebenso ein gemischtes lineares Modell verwendet. Hierzu wurde die „lme“ Funktion des NLME [Linear and Nonlinear Mixed Effects Models] Pakets in der Software R (Version 3.1.0, <http://cran.r-project.org>) verwendet. Ein P-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Qualitative Beschreibung

Die meisten Gelenke der BMP-2 Behandlungsgruppe (4 von 6) und alle Gelenke der IHH Behandlungsgruppe (8 von 8) zeigten hyalin-artiges Regeneratgewebe, während die Gelenke der GFP Kontrollgruppe (6 von $n = 6$) Reparationsgewebe minderer Qualität zeigten. Zwei Gelenke der BMP-2 Behandlungsgruppe zeigten eine ausgeprägte intraläsionale Knochenformation, während diese in der IHH Behandlungs- und in der GFP Kontrollgruppe nicht aufgetreten ist.

Die in 33% (2 von 6) der BMP-2 behandelten Gelenke aufgetretene intraläsionale Knochenformation wurde durch das Vorhandensein folgender Charakteristiken gekennzeichnet:

- Knochenwachstum über das Niveau des nativen benachbarten Knorpels, bzw. Abwesenheit einer knorpeligen Oberfläche;
- Abwesenheit von Typ II Kollagen im Reparationsgewebe;
- Starker Nachweis von Typ I und X Kollagen innerhalb des Reparationsgewebes.

Diese histologischen Charakteristiken sind an dem in 3-1 dargestellten BMP-2 behandelten Gelenk erläutert.

3. Ergebnisse

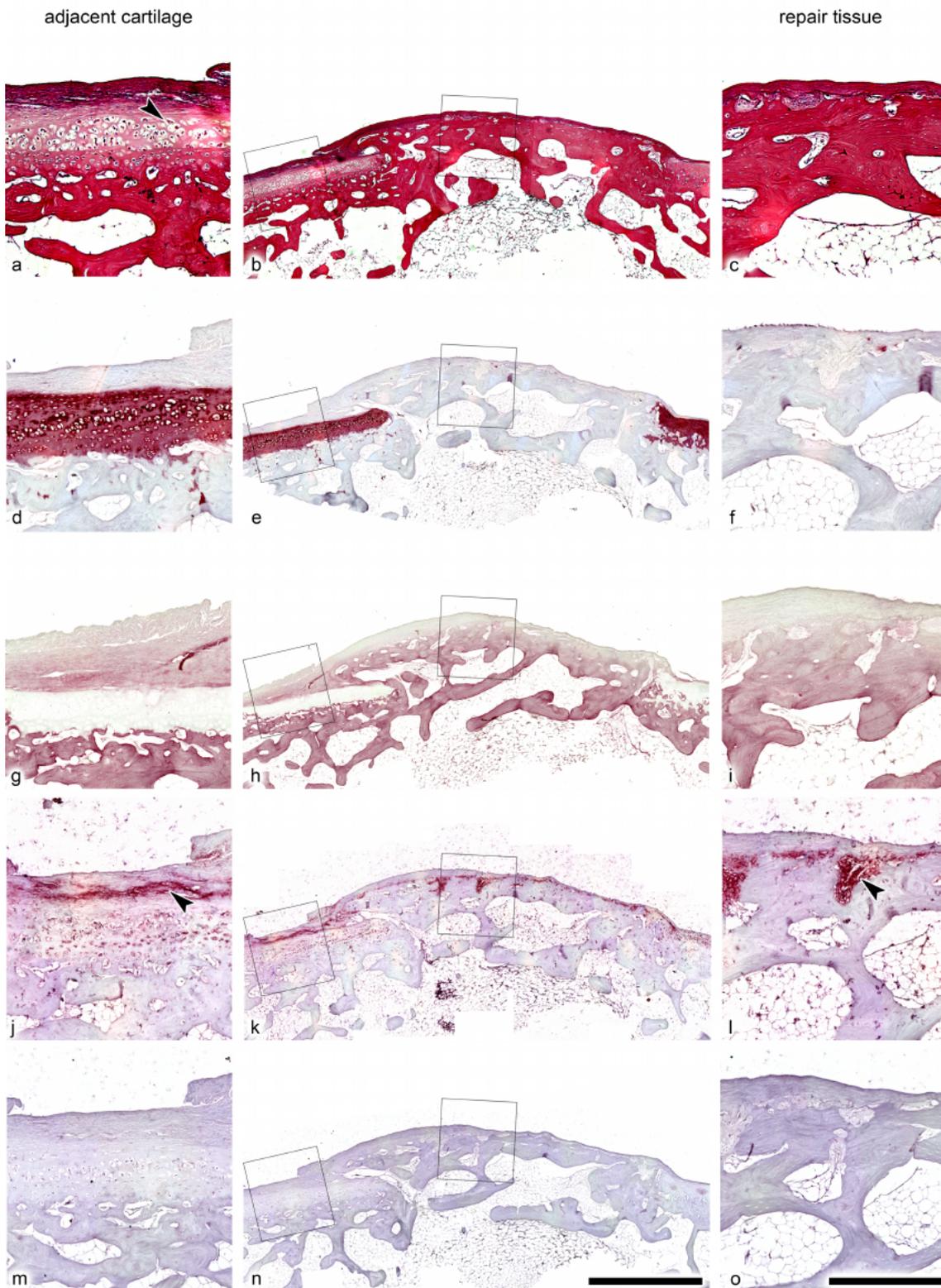


Abbildung 3-1 Intraläsionale Knochenformation innerhalb der BMP-2 Behandlungsgruppe. Das gezeigte Gelenk zeigt alle in 3.1. genannten Kriterien der intraläsionalen Knochenformation nach BMP-2 Behandlung. Knochenwachstum über das Niveau des nativen angrenzenden Knorpels (a-c, HE-Färbung), Abwesenheit von Typ II Kollagen innerhalb des Reparaturgewebes (d-f, immunhistochemische Typ II Kollagen Färbung), starker Nachweis

3. Ergebnisse

von Typ I Kollagen im Reparationsgewebe (g-i, immunhistochemische Typ I Kollagen Färbung), sowie eine starke Typ X Kollagen Deposition angrenzend an die Zone der Knochenformation (Pfeile in j-l, Typ X Kollagen Immunhistochemische Färbung). Bilder m-o zeigen die Negativkontrolle (Mausserum) zur Typ X Kollagen Färbung. Messbalken: 1,5mm in Übersichtsaufnahmen (b, e, h, k, n), 500 µm in Detailaufnahmen (a, c, d, f, g, i, j, l, m, o).

3.2. Reliabilität: Korrelation zwischen den Bewertern

Eine hohe Korrelation zwischen den drei unabhängigen Untersuchern wurde für den ICRS II Parameter „Generelles Assessment“ (Primäres Outcome), sowie für die explorativen Outcomes „Zelluläre Morphologie“, „Oberflächenarchitektur“, „Formation der Tidemark“, „Abnormitäten des subchondralen Knochens“, „Abnormale Kalzifikation“, „Assessment der Oberfläche und superfiziellen Zone“, sowie für das „Assessment der mittleren und tiefen Zone“ beobachtet (siehe Tabelle 3-1). Die Untersucher korrelierten moderat in der Bewertung der Parameter „Gewebemorphologie (unter polarisiertem Licht)“, „Basale Integration“ und „Vaskularisation des Reparationsgewebes“. Gering korrelierten lediglich die Bewertungen der Parameter „Chondrozytäres Clustering“ und „Inflammation“.

Die beobachteten Inter-Rater-Korrelationen waren in acht der Parameter vergleichbar oder höher als in der Erstpublikation des ICRS II von Mainil-Varlet *et al.* [163].

3.3. Efficacy: Primäre Outcome Measures

3.3.1. ICRS II – Generelles Assessment

Dreizehn Wochen nach der Intervention, zeigten mit IHH und BMP-2 behandelte Gelenke höhere Punktzahlen in dem ICRS II Parameter „Generelles

3. Ergebnisse

Assessment“ als Gelenke der GFP Kontrollgruppe: +33.0 (−0.4, 66.4; 95% CI) Punkte nach IHH Behandlung und +8.5 (−26.6, 43.7) Punkte nach BMP-2 Behandlung. Beide Effekte erreichten nicht das designierte Niveau statistischer Signifikanz (P = 0.052 und 0.537).

Tabelle 3-1 **Korrelation zwischen den Bewertern** – Pearsons Korrelationskoeffizient

ICRS II Parameter	Bewerter 1 vs. 2	Bewerter 1 vs. 3	Bewerter 2 vs. 3
Hohe Korrelation			
ICRS II 3. Zelluläre Morphologie	.888	.872	.860
ICRS II 5. Oberflächenarchitektur	.776	.774	.818
ICRS II 7. Formation der Tidemark	.745	.784	.676
ICRS II 8. Abnormitäten des subchondralen Knochens	.802	.679	.741
ICRS II 10. Abnormale Kalzifikation / Ossifikation	.853	.786	.723
ICRS II 12. Assessment der Oberfläche und superfiziellen Zone	.830	.783	.693
ICRS II 13. Assessment der mittleren und tiefen Zone	.894	.881	.853
ICRS II 14. Generelles Assessment	.890	.930	.926
Moderate Korrelation			
ICRS II 1. Gewebemorphologie (unter polarisiertem Licht)	.569	.818	.545
ICRS II 6. Basale Integration	.558	.514	.561
ICRS II 11. Vaskularisation des Reparaturgewebes	.567	.705	.638
Geringe Korrelation			
ICRS II 4. Chondrozytäres Clustering	.640	.195	-.017
ICRS II 9. Inflammation	.136	.523	.107
ICRS II 2. Färbbarkeit der Matrix (Metachromasie)	na *	na *	na *

* Die Korrelation zwischen den Bewertern wurde für den Parameter Anfärbbarkeit der Matrix nicht ausgewertet, da das semiquantitative Scoring aus den in Kapitel 3.4.3. genannten Gründen nicht möglich war.

3.3.2. Typ II Kollagen positive Fläche (%)

IHH Behandlung resultierte in einem erhöhten Anteil der Typ II Kollagen positiven Fläche in dem erzeugten chondralen Defektbereich, während für die BMP-2 Behandlung keine erhöhte Typ II Kollagendeposition beobachtet wurde: +18.7 (-4.5, 42.0) Punkte nach IHH und +0.0 (-29.7, 29.8) Punkte nach BMP-2 Behandlung. Die erhöhte Typ II Kollagen Deposition nach IHH Behandlung erreichte nicht das Level statistische Signifikanz ($P = 0.093$).

Die arithmetischen Mittel der Gruppen für die jeweiligen Parameter, korrespondierende 95% CIs und die P-Werte der Gruppenunterschiede sind Tabelle 3-2 zu entnehmen und in Abbildung 3-2 als Dotplots dargestellt. In Abbildung 3-3 sind histologische Aufnahmen eines BMP-2 behandelten Gelenkes und in Abbildung 3-4 eines IHH behandelten Gelenkes im Vergleich zur GFP Kontrollgruppe gezeigt.

3.4. Efficacy: Explorative Outcome Measures

3.4.1. ICRS II Parameter

Im Vergleich von BMP-2 behandelten Gelenken mit denen der GFP Kontrollgruppe wurde in keinem der ICRS II Parameter ein signifikanter Gruppenunterschied beobachtet. IHH behandelte Gelenke zeigten hingegen erhöhte Punktzahlen in allen untersuchten Parametern, welche in fünf der 12 explorativ untersuchten Parameter statistisch signifikante Gruppenunterschiede darstellten. Diese umfassten eine um 21.5 (3.6, 39.4) Punkte erhöhte Punktzahl im Parameter „Gewebemorphologie“, +21.0 (6.4, 35.7) Punkte im Parameter „Chondrozytäres Clustering“, +31.2 (0.8, 61.5) im Parameter „Formation der Tidemark“, +17.3 (0.2, 34.5) im Parameter „Abnorme

3. Ergebnisse

Kalzifizierung“ und +35.0 (4.6, 65.2) im „Assessment der mittleren und tiefen Zone“.

3.4.2. Marker chondrozytärer Hypertrophie

Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte in allen Gruppen ein vergleichbares perizelluläres Muster der Typ X Kollagen Deposition beobachtet werden. Lediglich in Gelenken mit ausgeprägter intraläsionaler Knochenformation wurde eine erhöhte Typ X Kollagen Deposition beobachtet.

Tabelle 3-2 **Histologische Qualität des Reparationsknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit BMP-2, IHH oder nicht-chondrogenen GFP.** Arithmetische Mittel der Gruppen und 95% CIs (Untere Grenze, Obere Grenze). Ein Score von 100 entspricht Eigenschaften des hyalinen Gelenknorpels oder einer Typ II Kollagen Deposition innerhalb der gesamten Defektfläche. * weist auf einen P-Wert < 0.05 hin.

	GFP (n=3; 6 Observationen)	IHH (n=4; 8 Observationen)	P	BMP-2 (n=3; 6 Observationen)	P
Primäre Outcomes					
Typ II Kollagen positive Fläche (%)	52.2 (26.4, 78.0)	70.9 (48.6, 93.3)	0.093	52.2 (26.4, 78.0)	0.999
ICRS II – 14. Generelles Assessment	34.0 (2.9, 65.1)	67.0 (40.1, 94.0)	0.052	51.1 (19.9, 82.2)	0.537
Explorative Outcomes					
ICRS II – 1. Gewebemorphologie	25.0 (5.6, 44.4)	46.5 (29.7, 63.3)	0.027 *	43.9 (24.5, 63.3)	0.287
ICRS II – 2. Färbbarkeit der Matrix	n.a.	n.a.		n.a.	
ICRS II – 3. Zelluläre Morphologie	41.8 (11.9, 71.8)	65.4 (39.5, 91.3)	0.104	53.1 (23.2, 83.0)	0.666
ICRS II – 4. Chondrozytäres Clustering	57.5 (43.5, 71.5)	78.5 (66.4, 90.7)	0.014 *	60.6 (46.5, 74.6)	0.797
ICRS II – 5. Oberflächenarchitektur	44.2 (19.8, 68.6)	80.6 (59.5, 101.7)	0.055	67.7 (43.3, 92.1)	0.279
ICRS II – 6. Basale Integration	65.1 (44.3, 85.8)	84.6 (66.6, 102.5)	0.122	74.7 (53.9, 95.4)	0.583
ICRS II – 7. Formation der Tidemark	24.9 (3.9, 45.9)	56.0 (37.8, 74.3)	0.046 *	49.9 (28.9, 70.9)	0.179
ICRS II – 8. Abnormitäten des subchondralen Knochens	39.1 (16.3, 61.9)	69.4 (49.7, 89.1)	0.077	63.3 (40.5, 86.0)	0.199
ICRS II – 9. Inflammation	83.1 (72.2, 93.9)	100.0 (90.6, 109.4)	0.106	96.7 (85.8, 107.6)	0.256
ICRS II – 10. Abnorme Kalzifizierung	58.2 (27.8, 88.6)	75.5 (49.2, 101.8)	0.048 *	52.3 (21.9, 82.7)	0.821
ICRS II – 11. Vaskularisierung	59.7 (34.8, 84.6)	75.8 (54.2, 97.3)	0.172	54.9 (30.0, 79.8)	0.821
ICRS II – 12. Assessment der Oberfläche und superfiziellen Zone	37.2 (10.4, 64.0)	60.8 (37.6, 84.1)	0.116	57.3 (30.5, 84.1)	0.417
ICRS II – 13. Assessment der mittleren und tiefen Zone	34.2 (3.1, 65.3)	69.1 (42.2, 96.0)	0.031 *	47.6 (16.5, 78.6)	0.621

3. Ergebnisse

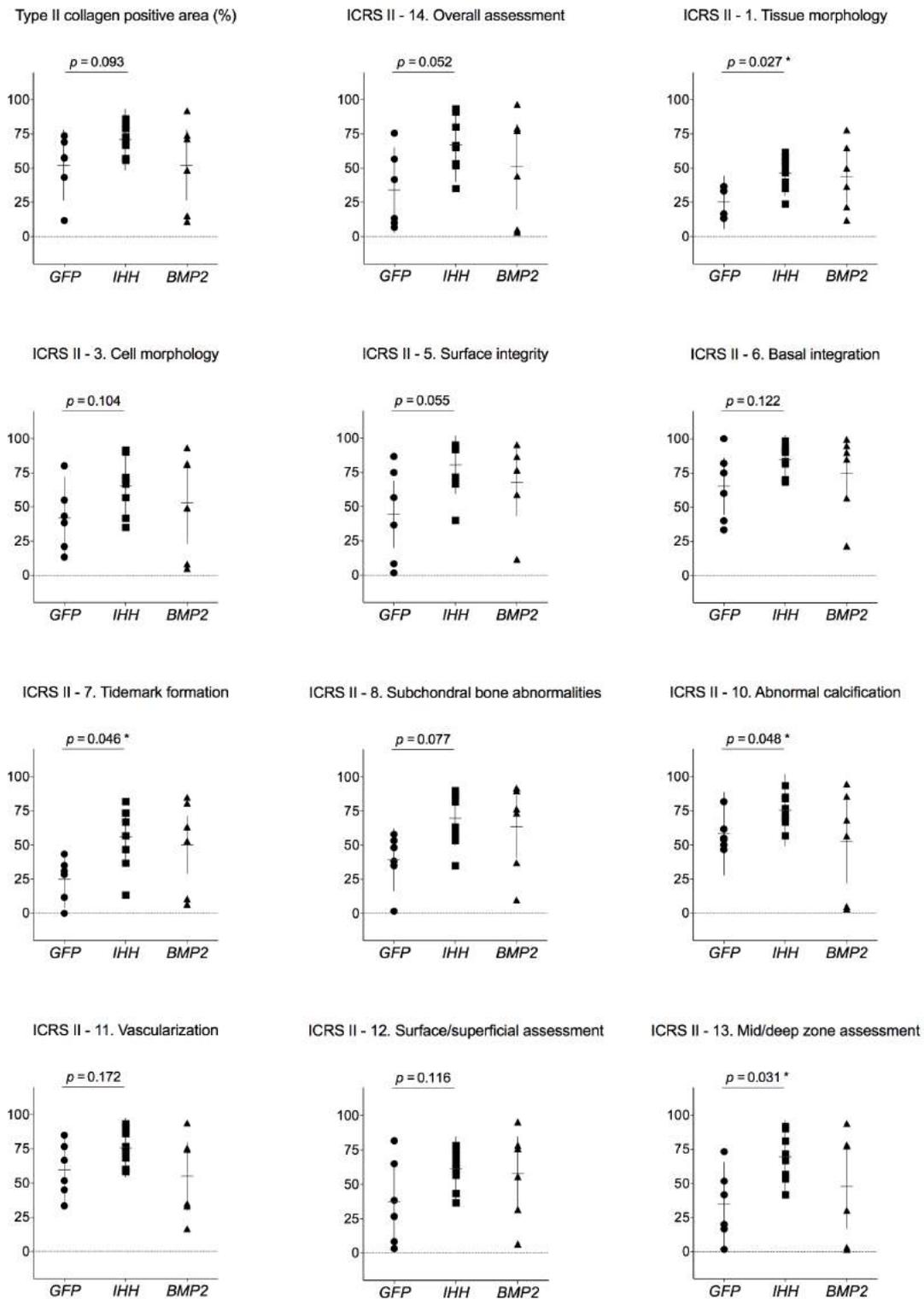


Abbildung 3-2 Histologische Qualität des Reparatorknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit BMP-2, IHH oder nicht-chondrogenen GFP. Die Dotplots zeigen die Ergebnisse von 12 der 14 untersuchten Parameter (Chondrozytäres Clustering und Inflammation sind nicht abgebildet aufgrund der niedrigen Korrelation zwischen den Untersuchern in der Bewertung dieser Parameter). Jeder Punkt entspricht der Bewertung eines

3. Ergebnisse

Gelenkes, beide Gelenke eines Tieres wurden mit dem gleichen Transgen behandelt. Die horizontalen Striche entsprechen dem arithmetischen Mittel der Gruppe, die vertikalen Striche entsprechen dem jeweiligen 95% CI. Während die beobachtete Überlegenheit von IHH gegenüber GFP in den beiden designierten primären Outcomes (Typ II Kollagen positive Fläche (%) und ICRS II „Generelles Assessment“ [engl. „overall assessment“]) nicht das Niveau statistischer Signifikanz erreichte, wurde die Überlegenheit in den Parametern 1. Gewebemorphologie [eng. Tissue morphology], 7. Formation einer Tidemark [engl. Tidemark formation], 10. Abnorme Kalzifikation [engl. Abnormal calcification] und 13. Assessment der mittleren und tiefen Zone [engl. Mid/deep zone assessment] als statistisch signifikant angesehen. BMP-2 behandelte Gelenke zeigten keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zur GFP Kontrollgruppe.

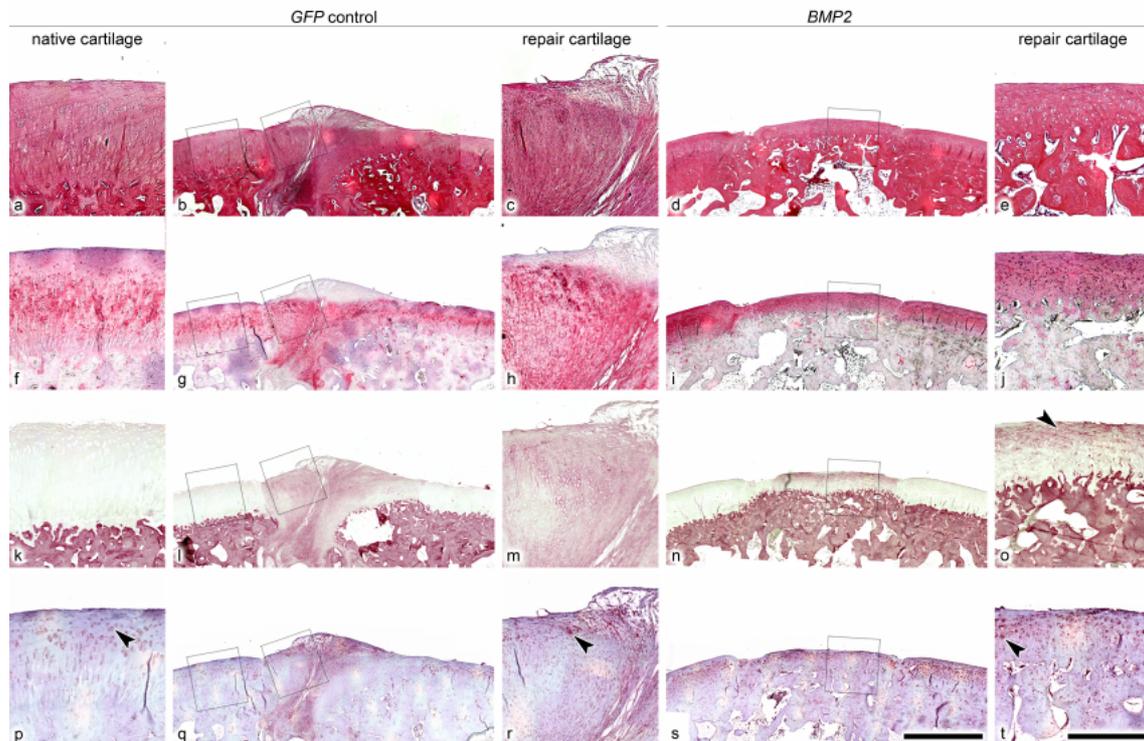


Abbildung 3-3 Histologische Qualität des Reparatursknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit BMP-2 oder nicht-chondrogenem GFP. HE Färbung (a-e), Typ II Kollagen immunhistochemische Färbung (f-j), Typ I Kollagen (k-o) und Typ X Kollagen (p-t) der BMP-2 und GFP Gruppe. Die HE Färbung demonstriert ein faserknorpeliges Reparatursgewebe in der GFP Kontrollgruppe (b,c), welches durch den Nachweis einer Typ I Kollagen Deposition (l, m) und die reduzierte Typ II Kollagen Deposition (g, h) unterstützt wird. Im Gegensatz zeigt das BMP-2 behandelte Gelenk die Morphologie hyalinen Gelenkknorpels in der HE Färbung (d, e), starke Typ II Kollagen Deposition (i, j) und nur wenig begleitende Typ I Kollagen Deposition (Pfeil in o). Im Allgemeinen wird die Deposition von Typ X Kollagen als Marker chondrozytärer Hypertrophie in einem perizellulärem Muster beobachtet (Pfeile in p, r, t). Das Ausmaß der Typ X Kollagenablagerung erscheint leicht erhöht in dem gezeigten BMP-2 behandelten Gelenk, jedoch übersteigt die Typ X Kollagenablagerung im Reparatursgewebe nicht die Ablagerung im nativen angrenzenden Knorpel (p-t). Der Balken symbolisiert 1,5 mm in den Panorama-Aufnahmen (b, d, g, i, l, n, q, s) und 500 µm in den vergrößerten Ausschnitten (a, c, e, f, h, j, k, m, o, p, r, t).

3. Ergebnisse

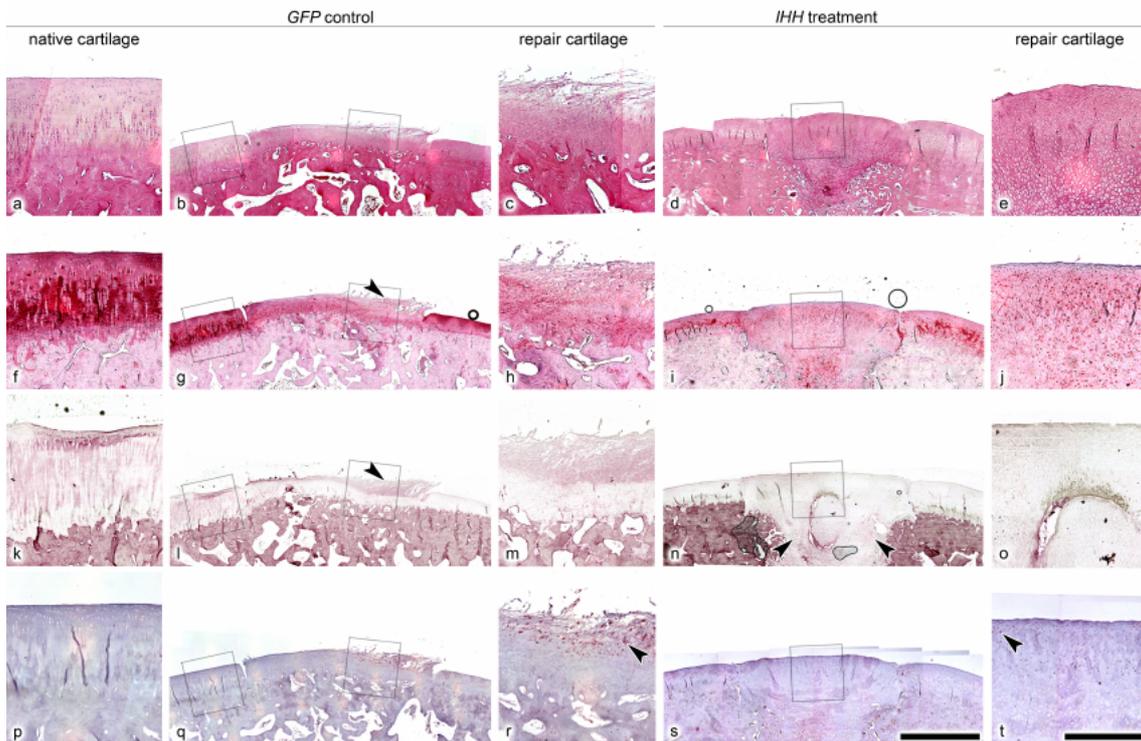


Abbildung 3-4 Histologische Qualität des Reparatorknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit IHH oder nicht-chondrogenem GFP. HE Färbung (a-e), Typ II Kollagen immunhistochemische Färbung (f-j), Typ I Kollagen (k-o) und Typ X Kollagen (p-t) der IHH und GFP Gruppe. Die Morphologie des Reparatorknorpelgewebes innerhalb des mit GFP behandelten Kontrollgelenkes erscheint faserknorpelig in der HE Färbung (b, c), was durch den Nachweis von Typ I Kollagen (Pfeil in l) und reduzierte Typ II Kollagen Deposition (Pfeil in g) unterstützt wird. Im Gegensatz zeigt das IHH behandelte Gelenk morphologische Charakteristiken des hyalinen Gelenkknorpels (d, e), inklusive der Deposition von Typ II Kollagen (i, j) und nicht nachweisbarer Typ I Kollagen Deposition (n, o). Das gezeigte Gelenk der IHH Gruppe zeigt eine beeinträchtigte Wiederherstellung des subchondralen Knochens (Pfeile in n), welches kein durchgängiger Fund in den IHH behandelten Gelenken war was durch die hohen Punktzahlen in dem ICERS II Parameter „Abnormitäten des subchondralen Knochens“ wiedergespiegelt ist. Keine substantiell unterschiedliche Typ X Kollagen Deposition wurde zwischen der IHH Behandlungs- und der GFP Kontrollgruppe beobachtet (r, t). Im Allgemeinen wurde die Deposition von Typ X Kollagen als Marker chondrozytärer Hypertrophie in einem perizellulärem Muster beobachtet (Pfeile in r, t). Der Balken symbolisiert 1,5 mm in den Panorama-Aufnahmen (b, d, g, i, l, n, q, s) und 500 µm in den vergrößerten Ausschnitten (a, c, e, f, h, j, k, m, o, p, r, t).

3.4.3. Proteoglykan/Glycosaminoglykan Deposition

Initial wurde der GAG-Nachweis durch die Alcianblau Färbung angestrebt. Trotz Modifikationen der Standardprotokolle konnte keine Anfärbbarkeit des Reparatorknorpelgewebes, sowie des nativen Gelenkknorpels gezeigt werden.

Mitgeführte osteochondrale Positivkontrollen eines humanen Handwurzelknochens zeigten in jedem der durchgeführten Läufe eine mäßige bis gute Matrix-Färbbarkeit. Diese Positivkontrollen wurden nur etwa 1 Woche in 4% PFA fixiert und über lediglich 3-4 Wochen in Calci-Clear Rapid (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA) entkalkt und somit 14 Wochen kürzer in den, die Anfärbbarkeit reduzierenden, Lösungen aufbewahrt als die Proben dieses Experimentes [19]. Die lange Fixationszeit in dieser Studie ist durch die Nutzung der Proben in einer parallelen MRT-Untersuchung begründet. Aldehydhaltige Fixationsmittel erzeugen Querverbindungen innerhalb und zwischen Proteinen. Um potentielle Bindungsstellen der Färbemittel freizulegen, wurden unterschiedliche Mikrowellenverfahren zur Spaltung der Querverbindungen getestet. Als Maximalleistung wurde bei den getesteten Schnitten 150 W über 3x 5 min ermittelt, ohne die Integrität der Schnitte zu gefährden. Diese Verfahren ermöglichten weiterhin keine Anfärbbarkeit. Als alternatives histochemisches Verfahren zum GAG-Nachweis wurde die Safranin-O / Fast-green Färbung durchgeführt. Auch hier erfolgte keine Färbung des Reparationsgewebes, sowie des nativen Knorpelgewebes, bei guter Anfärbung der Positivkontrolle. Es wurde der immunhistochemische Nachweis von PG und GAG (CS-4 und Aggrecan) angestrebt, blieb jedoch ohne Erfolg. In Zusammenschau ist von einer zu ausgeprägten Denaturierung oder dem Verlust der PG und GAG durch die verlängerte Fixationszeit auszugehen. Exemplarische Ergebnisse der Färbungen sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

3. Ergebnisse

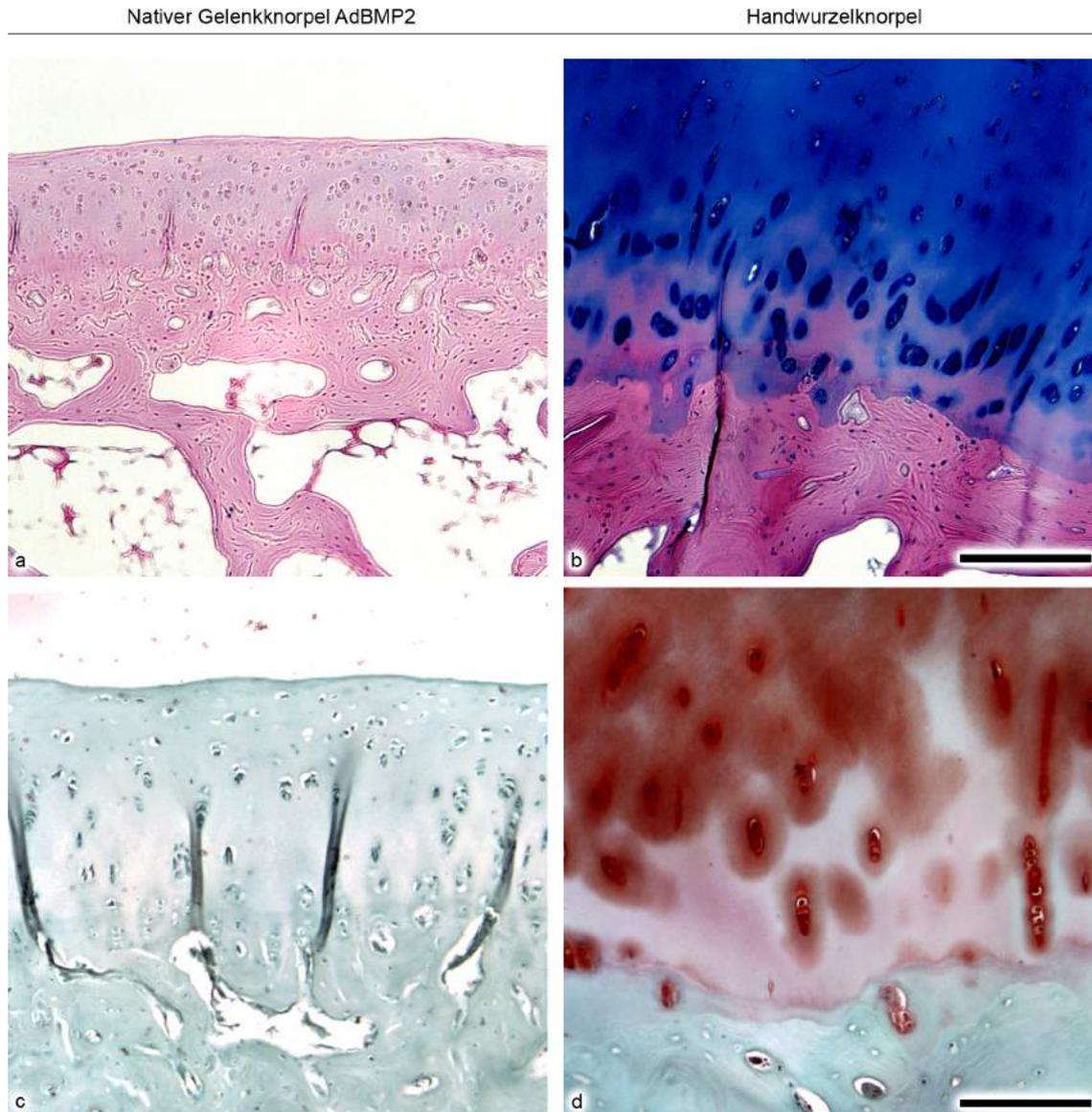


Abbildung 3-5 GAG-Färbungen. Dargestellt sind verschiedene GAG-Färbungen des nativen Gelenkknorpels eines Gelenkes der BMP-2 Behandlungsgruppe (a, c) mit den korrespondierenden Färbungen eines humanen Handwurzelknochens (b,d). Färbungen: (a, b) Alcianblau, (c, d) Safranin-O / Fast-green. Messbalken: (a, b) 500 μ m, 200 μ m (c, d). Während die humanen Handwurzelknochen eine starke Anfärbbarkeit in den verschiedenen GAG-Färbungen zeigten, zeigten die Proben des Tierversuches keine Anfärbbarkeit der Matrix des nativen Knorpels, sowie des Reparationsgewebes. Als ursächlich wird der lange Verbleib in Fixations- und Entkalkungslösung vermutet. Die als Positivkontrollen mitgeführten Schnitte von humanen Handwurzelknochen wurden insgesamt durchschnittlich 14 Wochen kürzer in den entsprechenden Lösungen aufbewahrt.

4. Diskussion

Das hier beschriebene Experiment ist das erste, welches die Wirksamkeit von IHH zur Induktion hyaliner Gelenkknorpelregeneration in osteochondralen Defekten in-vivo untersucht. Die Hypothese, dass direkter adenoviraler Gentransfer von *IHH* in osteochondrale Defekte, unter der Nutzung von autologen, Vektor-beladenen Knochenmarkkoagulaten, zu einer erhöhten histologischen Qualität des Reparationsgewebes (erfasst durch das ICRS II Histologic Scoring System) und zu einer verstärkten Typ II Kollagen Deposition führt (als der Transfer des nicht-chondrogenen *GFP*) wurde bestätigt. Die Hypothese, dass *BMP2* Gentransfer zu höherwertigen Reparationsergebnissen führt, wurde hingegen abgelehnt.

Im Folgenden werden die Effektivität und Limitationen von BMP-2 und IHH zur Förderung der Gelenkknorpelregeneration diskutiert, die Nutzung von gentherapeutisch optimierten Knochenmarkkoagulaten als Gentransfersystem in osteochondrale Gelenkknorpeldefekte bewertet, sowie methodische Aspekte dieser experimentellen Arbeit kritisch betrachtet.

4.1. BMP-2 für die Gelenkknorpelregeneration

4.1.1. Chondrogene Wirkung von BMP-2 in-vivo

Eine systematische Literaturrecherche ergab, dass die chondrogene Wirkung von BMP-2 bereits in verschiedenen in-vivo Studien beginnend untersucht wurde. Tabelle 4-1 enthält Informationen über die Methodik der systematischen Suche. Es konnten 325 Einträge mit unten genannter Suchstrategie identifiziert werden. Nach Durchsicht von Titel oder Abstract

wurden 30 Publikationen eingeschlossen (295 Titel ausgeschlossen). Der Volltext für die Extraktion der Daten war für 22 Publikationen verfügbar (Für 6 Publikationen existierte kein Zugang zu dem veröffentlichenden Journal; 2 Publikationen waren in chinesischer Sprache veröffentlicht). Aufgrund der Verwendung verschiedener Messgrößen war die quantitative Zusammenfassung der chondrogenen Wirkung nicht möglich. Es folgt eine qualitative Darstellung.

In proteinbasierten Verfahren zur Reparatur osteochondraler Defekte im Kaninchenmodell zeigte BMP-2 fast ausschließlich eine chondrogene Wirkung [126, 129, 142, 143, 146, 148, 152], während wenige Autoren keinen Effekt im Vergleich zur nicht mit BMP-2 behandelten Kontrolle feststellen konnten [138, Gruppe mit kurzzeitiger BMP-2 Exposition in 152].

In gentherapeutischen in-vivo Studien bestehen vergleichsweise weniger Kenntnisse. Bezüglich der Reparatur chondraler Defekte zeigte sich der *BMP2* Gentransfer im Ratten- [133, 142] und Minipigmodell [132 unter Ausnahme der Gruppe mit liposomalen Gentransfer] förderlich für die Gelenkknorpelreparation. Bezüglich der Gentherapie osteochondraler Defekte existieren lediglich Studien, die anhand DNA-beladener Matrices im Kaninchenmodell die chondrogene Wirkung zeigten [125, 126]. In qualitativer Zusammenfassung kann somit im Allgemeinen von einer förderlichen Wirkung des BMP-2 auf die Gelenkknorpelreparation ausgegangen werden. Das in dieser Arbeit dargestellte Experiment zeigt hingegen keinen positiven Gruppeneffekt nach *BMP2* Gentransfer, da einigen behandelten Defekten mit guter Knorpelqualität, diejenigen gegenüberstehen, die aufgrund der intraläsionalen Knochenformation eine sehr niedrige Qualität des Reparationsgewebes aufweisen.

4. Diskussion

Tabelle 4-1 BMP-2 für in-vivo Knorpelreparation: Systematische MEDLINE Recherche

	Info
Suchstrategie	Elektronische Suche aller Einträge bis zum 30.04.2012 in MEDLINE via pubmed.org mit den Suchbegriffen: ("cartilage"[MeSH Terms] OR "chondrogenesis"[MeSH]) AND "bone morphogenetic protein 2"[MeSH Terms]
Einschlusskriterien	
Studientyp	Prospektive kontrollierte Studien
Versuchsteilnehmer	Tiermodelle, Klinische Studien
Intervention	Alle Interventionen, welche die intraartikuläre oder intraläsionale Konzentration von BMP-2 bei Vorliegen von fokalen chondralen oder osteochondralen Gelenkläsionen erhöhen. Dies beinhaltet protein-basierte, sowie in-vivo und ex-vivo gentherapeutische Verfahren. Proteinbasierte ex-vivo Verfahren und ektope Implantationen wurden nicht eingeschlossen.
Kontrolle	Kontrollgruppen durften sich von den BMP-2 ⁺ Behandlungsgruppe nur in der Präsenz/Abwesenheit einer BMP-2 Exposition unterscheiden.
Primäres Outcome	Risikodifferenz der Osteophytenformation zwischen BMP-2 ⁺ Behandlungsgruppen und Kontrollgruppen
Ausgeschlossene Studien	
Dormer et al., 2011 [127]	TGF-β 1 Exposition nur in der BMP-2 ⁺ Interventionsgruppe
Dormer et al., 2012 [128]	TGF-β 1 Exposition nur in der BMP-2 ⁺ Interventionsgruppe
Gelse et al., 2001 [130]	Frequenz der Osteophytenformation nicht bestimmbar
Glansbeek et al., 1997 [135]	Frequenz der Osteophytenformation nicht bestimmbar
Liu et al., 2007 [136]	Ektope Implantation
Noël et al., 2004 [139]	Frequenz der Osteophytenformation nicht bestimmbar
Palmer et al., 2003 [140]	Publikation beschreibt Labormethoden, keine Studie
Sugiki et al., 2007 [145]	Ektope Implantation
Ueki et al., 2003 [149]	Generalisiertes Defektmodell: Kondylektomie

4.1.2. Osteophytenformation durch BMP-2 in-vivo: Eine Meta-Analyse

Aufgrund der anerkannten chondrogenen Wirkung und der klinischen Zulassung von rekombinanten BMP-2 zur Augmentation der Osteogenese, mag die klinische Anwendung von BMP-2 zur Augmentation der Chondrogenese erreichbar und wünschenswert sein. Yang *et al.* fordern auf dem Weg zur klinischen Anwendung mechanische Studien und längere Beobachtungszeiträume [152].

Aufgrund der in dieser Arbeit beobachteten intraläsionalen Knochenformation ist insbesondere die Überprüfung der Anwendungssicherheit zu fordern. Das Risiko der Osteophytenformation wurde in den Studien der oben beschriebenen systematischen Literaturrecherche quantitativ als Absolute Risikoreduktion [*RD*, engl. Risk Difference] zwischen BMP-2 exponierter Therapiegruppe [BMP-2⁺] und nicht-BMP-2 exponierter Kontrollgruppe [BMP-2⁻] zusammengefasst. Aufgrund der Heterogenität der Studien wurde ein Random-Effects Modell verwendet. Subgruppen wurden anhand der therapeutischen Methodik gebildet und analysiert.

Hierbei wurde bei den proteinbasierten Verfahren zur Therapie osteochondraler Defekte eine *RD* von 0.00 [- 0.03, 0.03 95% CI] ermittelt. Die Zahl der eingeschlossenen Proben beträgt in dieser Subgruppe $n = 206$ BMP-2⁺ und 136 BMP-2⁻. Getherapeutische Verfahren zeigen in der Zusammenfassung der publizierten und der eigenen Daten mit einer *RD* von 0.21 zwar ein höheres Risiko der Osteophytenformation, jedoch ist dieses bei einem 95% CI von - 0.08 bis 0.51 nach dem konventionellen Niveau nicht signifikant. Abbildung 4-1 zeigt die beschriebene Analyse als Forest-Plot. Die Arbeit von Di Cesare *et. al* wurde für diese Analyse ausgeschlossen, da sowohl ein proteinbasierter BMP-2⁺ und ein getherapeutischer BMP-2⁺ Interventionsarm, bei nur einer gemeinsamen BMP-2⁻ Kontrollgruppe existiert.

4. Diskussion

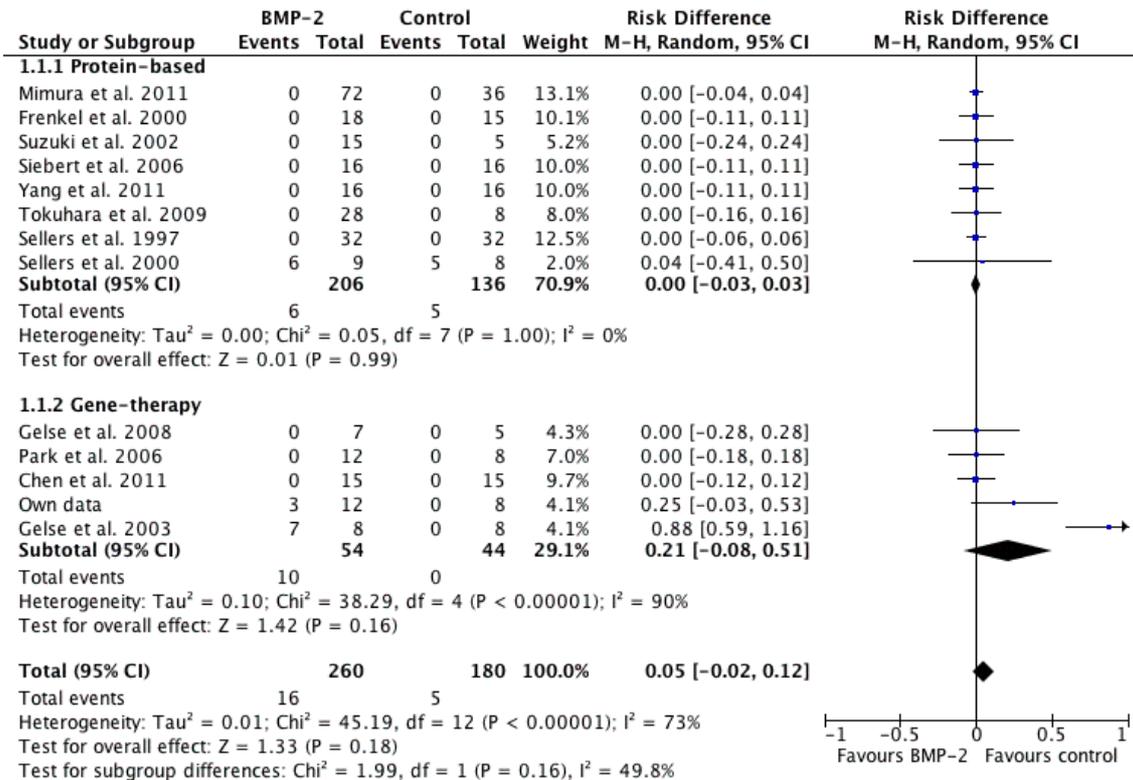


Abbildung 4-1 Risiko der Osteophytenbildung in in-vivo Studien von BMP-2 zur Gelenknorpelregeneration. In dem Forest-plot ist die Absolute Risikoreduktion [RD] bezogen auf die Frequenz der Osteophytenformation nach Einsatz von BMP-2 in Studien zur Knorpelreparation gegenüber adäquater Kontrollgruppen dargestellt. In der Subgruppenanalyse protein-basierter gegenüber gentherapeutischer Verfahren zeigen gentherapeutische Verfahren ein höheres Risiko der Osteophytenformation. Dieses erreicht unter Nutzung der eingeschlossenen Veröffentlichungen nicht das konventionelle Niveau statistischer Signifikanz.

Erstaunlicherweise zeigt sich in der Subgruppenanalyse der Gentherapieverfahren für die *lokalisierten ex-vivo* Gentherapieverfahren mit 0.29 [- 0.27, 0.84] eine höhere RD als die der in-vivo Gentherapieverfahren. Diese fällt mit 0.04 (- 0.09, 0.18) niedrig aus, was durch die Studie von Di Cesare et al. mitbegründet ist, in der nackte Plasmid-DNA innerhalb einer Kollagen-Matrix in Defekte transplantiert wurde [126]. Dieses Verfahren ist formal als in-vivo Gentransfermethode zu werten, zeigt jedoch verglichen mit viralen Vektoren eine reduzierte Transferrate. Die beschriebene Subgruppenanalyse ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Gruppengrößen betragen $n = 27$ BMP-2⁺ und 21 BMP-2⁻ für die ex-vivo Transduktion. Vor der Durchführung der vorliegenden Studie wurde das Risiko der

Osteophytenformation in *lokalisierten in-vivo Gentherapieverfahren* auf eine *RD* von 0.00 [- 0.10, 0.10] geschätzt, bei $n = 27$ von BMP-2⁺ und 24 BMP-2⁻. Unter Einschluss der Ergebnisse der vorliegenden Studie muss diese Risikoeinschätzung auf eine *RD* von 0.04 [- 0.09, 0.18] nach oben korrigiert werden. Nach Einschluss beträgt die Gruppengröße $n = 39$ BMP-2⁺ und 32 BMP-2⁻ für den in-vivo Gentransfer. In dieser Analyse sind zusätzliche Gelenke eingeschlossen, die bereits 8 Wochen nach der Intervention untersucht wurden. In Zusammenfassung aller untersuchten Gentransferverfahren für *BMP2*, liegt für diese ein erhöhtes Risiko für die Osteophyteninduktion vor. Dieses ist unter der Nutzung eines random-effects Modells mit einer *RD* von 0.17 [- 0.06, 0.40], bzw. 0.21 [- 0.08, 0.51] bei Einschluss der Di Cesare Arbeit [126], jedoch nicht statistisch signifikant.

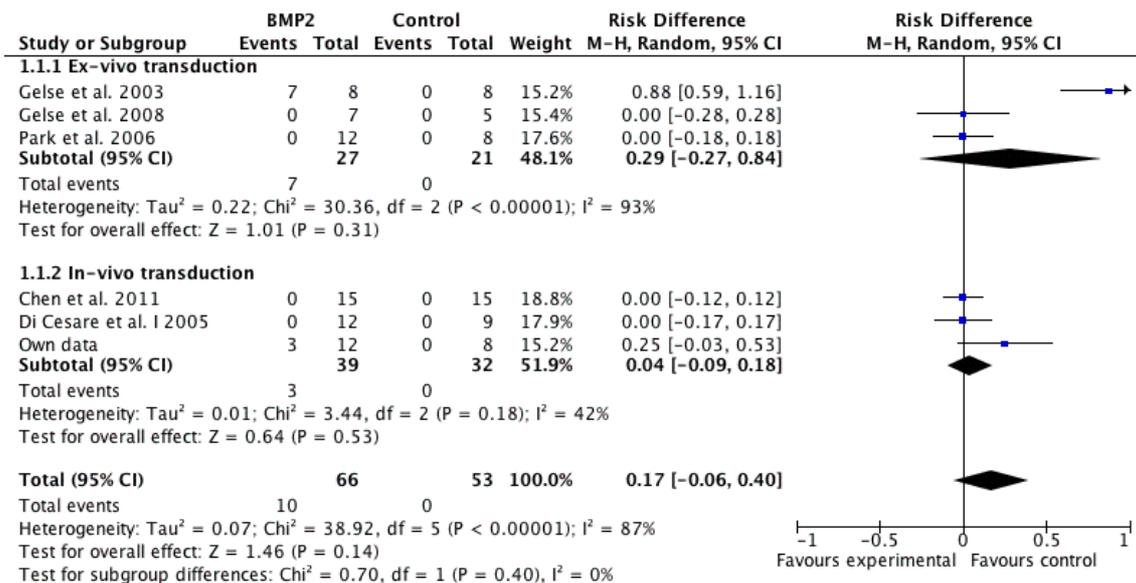


Abbildung 4-2 Risiko der Osteophytenbildung in in-vivo Studien von BMP-2 zur Gelenkknorpelregeneration: Subgruppenanalyse von ex-vivo und in-vivo Gentherapieverfahren. Dargestellt ist die Absolute Risikoreduktion [RD] bezogen auf die Frequenz der Osteophytenformation; nach Einsatz von BMP-2 in Studien zur Knorpelreparation gegenüber adäquater Kontrollgruppen. In der Subgruppenanalyse von Verfahren mit ex-vivo gegenüber in-vivo Transduktion zeigen Verfahren mit ex-vivo Transduktion ein höheres Risiko der Osteophytenformation. Dieses erreicht unter Nutzung der eingeschlossenen Veröffentlichungen nicht das konventionelle Niveau statistischer Signifikanz.

4.1.3. Modulation der Osteophytenformation

Diese Arbeit deutet darauf hin, dass bei effektiver Inhibition der Osteophytenbildung, eine BMP-2 Behandlung potentiell die histologische Qualität des Knorpelreparationsgewebes verbessern könnte. Wie Abbildung 3-1 vermuten lässt, liegt bei der Osteophytenformation ein Mechanismus analog der enchondralen Osteogenese vor. Hypertrophe Chondrozyten deponieren insbesondere am Knorpel-Knochen-Interface Typ X Kollagen. Eine nachfolgende Resorption, Vaskularisierung und Osteogenese analog den Vorgängen der Epiphysenfuge wird vermutet (siehe auch Kapitel 1.2.5). Im Hinblick auf die klinische Nutzung sind Strategien der Modulation von Hypertrophie und Osteophytenformation erforderlich. In Kapitel 1.5.3. „Inhibition der hypertrophen Differenzierung“ sind insbesondere Strategien zur Dämpfung oder Umgehung der TGF- β Signalwege dargestellt. Im Folgenden werden Strategien zur Modulation der hypertrophen Differenzierung und Osteophytenformation dargestellt, die weiterhin die Induktion der Chondrogenese über TGF- β Signalwege ermöglicht.

Zur Verhinderung der Osteoblasteneinwanderung und dem Einströmen von Zellen des peripheren Blutes kann bei osteochondralen Defekten die Versiegelung des Knochendefektes mit entsprechenden Materialien erwogen werden [29]. Die Durchbrechung der subchondralen Kompakta zur Einwanderung pluripotenter Zellen ist somit zum einen das Hauptprinzip markraumeröffnender Verfahren, sowie des in dieser Studie verwendeten Verfahrens, stellt jedoch gleichzeitig eine Limitation dieser Verfahren dar. Noël et al. schreiben BMP-2 die Förderung der Angiogenese zu, welche zur Knochenformation beitragen könnte. In Ihrem Versuchsaufbau versuchten sie die Neoangiogenese durch das antiangiogenetischen Fusionsprotein K3HSA zu modulieren. Die alleinige Blockierung der Neoangiogenese durch K3HSA vermochte in-vivo jedoch weder die Ossifikationen, noch die Zahl der Gefäße zu reduzieren [139]. Die Hypothese, dass ein wirkungsvoller

antiangiogenetischer Faktor, welcher effektiv die Zahl der Gefäßneubildungen vermindern kann, Ossifikationen verhindert, bleibt bestehen.

Tscheudschilsuren et al. beschreiben in-vitro eine inhibierende Wirkung des sekretierten Protein Melanoma inhibitory activity [MIA] auf die Osteogenese. Verglichen wurden humane mesenchymale Stammzellen, welche in BMP-2 haltigen Medien kultiviert wurden. Addition von MIA zum Kulturmedium führte zur gesteigerten Typ II Kollagen und Aggrecan Synthese und einer down-Regulation der osteogenen Markergene Osteopontin und Osteocalcin [165].

Liu et al. beschreiben eine inhibierende Wirkung Triiodthyronins [T3] auf die hypertrophe Differenzierung bei BMP-2 und Insulin induzierter Redifferenzierung von humanen Chondrozyten nach in-vitro Passage [136].

Zusammenfassend stehen mit MIA, T3 und antiangiogenetischen Molekülen potentielle Faktoren zur Modulation der chondrogenen Hypertrophie und Osteogenese nach BMP-2 vermittelter chondrogener Differenzierung zur Verfügung. Ergebnisse aus in-vivo Knorpelreparationsstudien stehen für die Diskussion der Wirksamkeit oben genannter Faktoren aktuell nicht zur Verfügung. Diese liegen lediglich für die Kombination von BMP-7 und Thrombospondin-1 [TSP-1] vor. TSP-1 konnte in Defekten nach Mikrofrakturierung in einem Minipig-Modell die Produktion von Typ X Kollagen, sowie Ossifikationen vermindern [166].

4.1.4. Klinische Anwendung von BMP-2 zur in-vivo Knorpelreparation

Aufgrund der in 4.1.2. dargestellten Studien und der Sicherheitsproblematik der viralen Vektoren im Allgemeinen, erscheint eine klinische Anwendung proteinbasierter Verfahren zum Einsatz von BMP-2 zur Knorpelreparation leichter umsetzbar als Gentherapieverfahren. Da jedoch eine

Dosisabhängigkeit für das Risiko der Osteophytenbildung bestehen könnte, sind auch die proteinbasierten Verfahren genau auf das Risiko dieser unerwünschten Wirkung zu prüfen. Die zur Erfassung des Risikos notwendigen Fallzahlen (beispielsweise zur Planung eines Großtierversuches), sind in Tabelle 4-2 angegeben. Eine Studie mit adäquater Power zum Ausschluss der Osteophytenformation als „sehr häufige“ Nebenwirkung, sollte 135 Fälle in der BMP-2 Therapiegruppe und ebenso viele in der Kontrollgruppe umfassen. Im Falle einer Zulassung müssen Mechanismen der Überwachung etabliert werden, da der Ausschluss seltenerer Nebenwirkungen enorme Fallzahlen benötigt.

Tabelle 4-2 Benötigte Versuchstierzahl zum Ausschluss von unerwünschten Wirkungen: Power-Analyse

Rate der Unerwünschten Wirkung		Zum Ausschluss benötigte Fallzahl (n)	
		Power 0.80	Power 0.95
Sehr häufig	≥ 1/10	78	135
Häufig	≥ 1/100 bis < 1/10	905	1 567
Gelegentlich	≥ 1/1 000 bis < 1/100	9 061	15 703
Selten	≥ 1/10 000 bis < 1/1 000	90 624	157 070
Sehr selten	< 1/10 000		

Die Power-Analyse wurde mittels G*Power Version 3.1.3 (© Franz Faul, Edgar Erdfelder, Albert-Georg Lang, und Axel Buchner) anhand eines einseitigen Einstichproben-Binomial Tests durchgeführt. Für die Wahrscheinlichkeit des α Fehlers wurde .05 eingesetzt.

4.2. IHH für die Gelenkknorpelregeneration

In in-vitro Studien konnte bereits die chondrogene Wirkung des adenoviralen *IHH* Gentransfers auf humane BMSCs gezeigt werden [159]. Nach Transfer von *IHH* allein, oder in Kombination mit *BMP2*, *SOX9* und *TGFB1* (TGF- β 1 kodierend), zeigten BMSCs in Pelletkultur eine stärkere Deposition von Typ II Kollagen und CS-4 in der EZM, sowie eine erhöhte GAG-Synthese in den

biochemischen Assays [159]. Nach diesen vielversprechenden in-vitro Ergebnissen, stellt sich die Frage, ob IHH auch im in-vivo Modell die Knorpelreparation induzieren kann und somit eine Möglichkeit zur chondrogenen Induktion unter Umgehung des TGF- β Signalweges ermöglicht.

4.2.1. Chondrogene Wirkung von IHH in-vivo

In-vivo Studien über IHH beschränken sich fast ausschließlich auf entwicklungsbiologische Studien mit besonderem Fokus auf die Entwicklung der langen Röhrenknochen [167], Entwicklung des Gelenkknorpels [168], und des Bandscheibengewebes [169].

Mittels einer systematischen Literaturrecherche mit der in Tabelle 4-3 Suchstrategie und Einschlusskriterien wurden 202 Hits erzeugt. Nach Durchsicht der Abstracts konnte keine in-vivo Studie identifiziert werden, die IHH zur Knorpelreparation untersucht. Mittels gleicher Suchstrategie wurde eine Studie von Grande et al. identifiziert, die den Vergleich von SHH Gentransfer mit BMP-7 Gentransfer in periostalen mesenchymalen Stammzellen zur Reparatur osteocheondraler Defekte im NZWR-Experiment beschreibt [170]. Nach ex-vivo Transduktion mittels retroviraler Vektoren wurden die Zellen auf eine Polyglykolsäure [PGA, engl. polyglycolic acid] Matrix ausgesät und in osteochondrale Defekte der Femurochlea der NZWRs implantiert. Als Vergleichsgruppe wurde eine nicht-besiedelte PGA-Matrix eingesetzt. Nach 12 Wochen zeigten beide Gentransfergruppen bessere O'Driscoll Scores im Sinne einer Überlegenheit der Transplantation transduzierter Zellen. Um Einblicke in die biologischen Vorgänge zu erhalten, untersuchte die gleiche Gruppe die Knorpelqualität zum 6, 8, 12 und 26 Wochen Zeitraum und konnte Unterschiede zwischen SHH und BMP-7 beschreiben. Während zum 12 Wochen Zeitpunkt SHH die höchste

mikroskopische Knorpelqualität zeigte, wurde die Persistenz des chondrozytären Phänotyps in den subchondralen Defektanteilen über eine längere Zeit als in der BMP-7 behandelten Gruppe deutlich. Grande et al. beschrieben somit ein verzögertes subchondrales Remodelling als Charakteristikum von SHH Behandlung zur Knorpelreparation [170].

Tabelle 4-3 IHH für in-vivo Knorpelreparation: Systematische MEDLINE Recherche

	Info
Suchstrategie	Elektronische Suche aller Einträge bis zum 13.06.2013 in MEDLINE via pubmed.org mit den Suchbegriffen: ("cartilage"[MeSH Terms] OR "chondrogenesis"[MeSH]) AND "Hedgehog Proteins"[Mesh] ("cartilage"[MeSH Terms] AND repair) AND "Hedgehog Proteins"[Mesh] ("cartilage"[MeSH Terms] AND (defect OR lesion)) AND "Hedgehog Proteins"[Mesh]
Studientyp	Prospektive kontrollierte Studien
Versuchsteilnehmer	Tiermodelle, Klinische Studien
Intervention	Alle Interventionen, welche die intraartikuläre oder intraläsionale Konzentration von IHH bei Vorliegen von fokalen chondralen oder osteochondralen Gelenkläsionen erhöhen. Dies beinhaltet protein-basierte, sowie in-vivo und ex-vivo gentherapeutische Verfahren. Proteinbasierte ex-vivo Verfahren und ektope Implantationen wurden nicht eingeschlossen.
Kontrolle	Kontrollgruppen durften sich von den IHH+ Behandlungsgruppe nur in der Präsenz/Abwesenheit einer IHH Exposition unterscheiden.
Primäres Outcome	Risikodifferenz der Osteophytenformation zwischen BMP-2+ Behandlungsgruppen und Kontrollgruppen

Die vorliegende Arbeit beschreibt als erstes die Wirkung von IHH auf in-vivo Knorpelreparation im Allgemeinen und als in-vivo Gentransfer in osteochondrale Defekte im Speziellen. In Zusammenschau werden unter Beachtung der Reliabilität zum späten Beobachtungszeitpunkt statistisch signifikante, substantielle Effekte auf die *Gewebemorphologie (unter polarisiertem Licht), die Oberflächenarchitektur, die Formation der Tidemark, Abnormitäten des subchondralen Knochens, Abnorme Kalzifikation /*

Ossifikation, sowie das *Assessment der mittleren und tiefen Zone* gezeigt. Weitere substantielle Effekte, die nicht das konventionelle Niveau statistischer Signifikanz erreichen, wurden für die *Typ II Kollagen positive Fläche*, die *zelluläre Morphologie*, die *basale Integration* und das *generelle Assessment* beobachtet. Insbesondere bei letzterem wurde mit $p = .052$ das konventionelle Niveau statistischer Signifikanz nur knapp verfehlt. Moderate Effekte wurden bezüglich des gemeinsamen *Assessments der Oberfläche und superfiziellen Zone*, sowie der *Vaskularisierung* erzielt.

Aufgrund der geringen Reliabilität, gemessen an der Korrelation zwischen den Bewertern, sind nur eingeschränkte Aussagen über die Parameter *chondrozytäres Clustering* und *Inflammation* möglich. Insbesondere für das *chondrozytäre Clustering* wurde jedoch eine substantielle und statistisch signifikante Überlegenheit der IHH Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt.

4.2.2. Klinische Anwendung von IHH zur in-vivo Knorpelreparation

Diese Arbeit zeigt die positive Wirkung von IHH auf die Knorpelreparation in-vivo. Hierbei zeigt die IHH Behandlung Charakteristiken auf, die sie von der Behandlung mit TGF- β Superfamilienmitgliedern differenziert. Eine Induktion der Knorpelformation über alternative Signalwege durch IHH erscheint insbesondere zur Vermeidung der hypertrophen Differenzierung reizvoll, um eine langfristige hyaline Gelenkknorpelregeneration zu erzielen. In Bezug auf eine klinische Anwendung ist die Vermeidung der chondrozytären Hypertrophie in-vivo nachzuweisen. Hierbei ist neben der Immunhistochemie zur Darstellung von Typ X Kollagen auch der Einsatz von biochemischen und molekularbiologischen Verfahren empfohlen, da eine Quantifizierung von immunhistochemisch dargestelltem Typ X Kollagen als schwierig einzustufen

ist. Als sekretiertes Protein ist auch der Einsatz von IHH auf funktionalisierten Matrices denkbar und kann in entsprechenden Großtiermodellen (beispielsweise Knorpeldefektmodelle im Göttinger Minipig) untersucht werden. Hierdurch könnten Sicherheitsbedenken bezüglich der in-vivo Gentherapieverfahren umgangen werden. Chancen und Limitationen des in dieser Untersuchung verwendeten Gentransferverfahrens bezüglich einer klinischen Applikation werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.3. Autologe gentherapeutisch-optimierte Knochenmarkkoagulate für die Gelenkknorpelregeneration

Die Machbarkeit des Gentransfers mittels gentherapeutisch-optimierter Knochenmarkkoagulate in osteochondrale Defekte wurde bereits unter dem Einsatz von Marker-Genen im Kleintiermodell beschrieben [75]. Ein Nachweis der Effektivität des Systems in Bezug auf die verbesserte Knorpelreparation durch Transfer von Wachstumsfaktorgenen lag bei Konzeption dieser Arbeit nicht vor.

4.3.1. Effektivität

Durch diese Studie wurde nun die Wirksamkeit dieses *lokalisierten in-vivo Verfahrens* zur Augmentation der Gelenkknorpelreparation beschrieben. Durch den adenoviralen Transfer von *IHH* entsteht ein, gegenüber der *GFP* Kontrolle, höherwertiges Knorpelgewebe in osteochondralen Defekten.

Zum Teil wurde eine hohe Variabilität der Ergebnisse innerhalb der Therapiegruppen beobachtet, wie auch Abbildung 3-2 entnommen werden kann. Diese könnte auf die Variabilität der Zelldichte zurückzuführen sein [75]. Die Zahl der Zelldichte steht im Zusammenhang mit der Quantität der Transgenexpression [75] und vermag somit, für eine variable Wirkung und möglicherweise dosisabhängige Nebenwirkungen der exprimierten Transgene verantwortlich zu sein. Wie in Kapitel 1.5.7. dargelegt, kann die Transgenexpression um das Fünffache erhöht sein, wenn Koagulate der ersten mit denen der zweiten Aspiration verglichen werden. Zwischen den Versuchstieren wurden Variabilitäten bis zum Dreifachen der verglichenen Werte gemessen [75].

Nach Durchführung des Interventionsteiles dieser Arbeit, veröffentlichten Ivkovic et al. einen Nachweis der Effektivität des hier genutzten Verfahrens zur RepARATION von chondralen Defekten in den Femurkondylen von Schafen unter dem Einsatz von adenoviralem TGF- β 1 Transfers. Sechs Monate nach Durchführung der Intervention konnte insbesondere eine höhere Deposition von Typ II Kollagen in der Behandlungsgruppe gezeigt werden [171].

Somit liegen aktuell zwei präklinische Nachweise der Effektivität dieses Verfahrens zur Knorpelreparation vor. Bisher untersucht wurden *BMP2* und *IHH* Gentransfer in osteochondrale Defekte in NZWRs, sowie *TGFB1* Gentransfer in chondrale Defekte im Schaf-Großtiermodell.

4.3.2. Sicherheitsbedenken und mögliche Einsatzgebiete des Gentransfersystems

Die in-vivo Vektorapplikation kann zum einen eine lokale oder regionale Inflammation erzeugen und auch zur Dissemination des Vektors führen. Das in diesem Experiment beobachtete niedrige Inflammationsniveau weist im

Kontext der hohen Immunogenität der adenoviralen Vektoren auf ein gutes Vektor-„Containment“ innerhalb der autologen Koagulate hin. Die Problematik des intraartikulären Gentransfers von stark anabolen Wachstumsfaktoren, im Speziellen das Risiko fibrotischer Veränderungen der Gelenkkapsel, bleibt jedoch bestehen [82]. Auch in diesem Experiment mit gutem Vektor-„Containment“, konnte in einem der Gelenke die Ausbreitung des Reparationsgewebes über die Ausmaße des Defektes mit Beeinträchtigung des benachbarten nativen Knorpels, im Sinne einer Hypertrophie mit Typ X Kollagen Produktion, beobachtet werden (siehe Abbildung 3-1).

Die Gefahr der Vektordissemination bleibt ebenso bestehen, obwohl in dieser Arbeit und der Arbeit von Pascher et al. ein gutes Containment des Vektors innerhalb des Koagulates beobachtet wurde [75]. Insbesondere durch die Perforation der subchondralen Kompakta im Rahmen des Verfahrens kann möglicherweise eine Dissemination über das Gefäßsystem erfolgen. Diese wurde in den oben genannten Arbeiten zu dem eingesetzten System nicht untersucht, jedoch wurde durch Futagawa et al. die Dissemination replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren nach Transplantation an reich-vaskularisierte Lokalisationen beschrieben [172, 173]. Die Therapie von chondralen Defekten mit erhaltener subchondraler Lamelle mag diesbezüglich günstigere Eigenschaften haben, die Einschätzung des Risikos der Dissemination ist bisher jedoch nicht erfolgt.

Die Vorteile des Verfahrens umfassen die gezeigte Wirksamkeit im Klein- und Großtiermodell und die ressourcensparenden Eigenschaften dieses einzeitigen Verfahrens. Aufgrund der oben dargestellten Sicherheitsbedenken ist als Einsatzgebiet dieses Verfahrens weniger die klinische Anwendung, als die Testung von Kandidatengen zur Gelenkknorpelregeneration im präklinischen Modell anzusehen. Hier treten Sicherheitsbedenken in den Hintergrund und die effiziente Nutzung von Ressourcen wie OP- und Laborzeiten, sowie des Materialaufwandes haben eine höhere Bedeutung. Die Variabilität des Verfahrens kann während der Versuchsplanung im Rahmen der Power-Analyse

berücksichtigt werden. Zudem besteht die Möglichkeit, für jedes transplantierte Koagulat ein in-vitro Koagulat zur Überprüfung des Transgenexpressionslevels mitzuführen, da die Variabilität zwischen den Koagulaten einer Aspiration als gering beschrieben wurde [75].

In Bezug auf eine klinische Anwendung von gentherapeutischen Verfahren werden foamyvirale Vektoren im Rahmen einer Forschungsförderung des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung [IZKF] an der Universität Würzburg untersucht (IZKF Projekt D-23).

4.3.3. Alternative Protein-Delivery-Systeme

Um Sicherheitsbedenken der Gentherapieverfahren zu umgehen, erscheint ein Einsatz funktionalisierter Matrices vielversprechend. Konventionelle Matrices für Tissue Engineering Zwecke, die beispielsweise auf PGA, Polylactiden [PLA, engl. polylactic acid] oder Polylactid-Polyglykolsäure [PLGA, engl. polylactic-co-glycolic acid] basieren, bieten wenig „funktionelle“ Gruppen [174]. Funktionelle Gruppen umfassen beispielsweise Amino- und Carboxygruppen, welche die Kopplung von bioaktiven Molekülen, wie etwa Wachstumsfaktoren, ermöglichen [174]. Wie von Liu et al. zusammengefasst, wurden PGA, PLA und PLGA bereits mit verschiedenen Monomeren co-polymerisiert, um funktionelle Gruppen in die Matrices einzuführen [174].

Die Entwicklung biomimetischer Hydrogele mit EZM-Bestandteilen und in Nano- und Mikrosphären eingekapselten Wachstumsfaktoren zur Knorpelreparation erfolgt aktuell in dem IZKF Projekt D-219 an der Universität Würzburg.

4.4. Methodische Aspekte dieser Studie

4.4.1. Statistische Power

Das hier beschriebene Experiment stellt die erste Veröffentlichung über die Effektivität von IHH zur in vivo Behandlung von Gelenkknorpeldefekten dar. Entsprechend dem „Proof of Concept“ Charakter dieser Studie, konnten zur Planung der Versuchstierzahl keine vorbeschriebenen Daten herangezogen werden. Die hier beschriebenen Effektgrößen können jedoch nun als Grundlage zur Planung weiterer Experimente dienen. Während die Behandlung mit IHH im Vergleich zur Behandlung mit dem nicht-chondrogenen GFP zur besseren Bewertung aller untersuchter histologischer Parameter führte, so wurde das Niveau statistischer Signifikanz nur in 5 der 14 Parameter erreicht. Zum Teil wurde das Signifikanzniveau trotz hoher Effektgrößen nicht erreicht, welches durch eine zu geringe statistische Power begründet sein kann.

Zur Maximierung der statistischen Power sind Studiendesigns zu bevorzugen, die lediglich eine Interventions- und eine Kontrollgruppe vergleichen. Unter der Verwendung der hier ermittelten Werte, ist die Analyse von 4 unabhängigen Gelenken pro Gruppe nötig um eine Überlegenheit von IHH gegenüber GFP im histologischen Parameter „Generelles Assessment“ mit einer > 90-prozentigen Power zu detektieren (alpha: 0.05, zweiseitiger Signifikanztest; berechnet mit G*Power Version 3.1 unter der Verwendung der Effektgröße $d = 3.4$). Für Parameter mit kleineren Effektgrößen (z.B. „Assessment der Oberfläche und superfiziellen Zone“) ist der Einschluss von 7 unabhängigen Gelenken pro Gruppe nötig um eine statistische Power von 90% zu erreichen (alpha: 0.05, zweiseitiger Signifikanztest; berechnet mit G*Power Version 3.1 unter der Verwendung der Effektgröße $d = 1.9$). Experimentelle Designs mit dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen, sowie zusätzlicher Zeitpunkte erhöhen die benötigte Fallzahl.

Neben der statistischen Signifikanz der Gruppenunterschiede in den erhobenen Messwerten, sollten auch die Relevanz beobachteter Effektgrößen im Anbetracht der verwendeten histologischen Outcomes kritisch betrachtet werden (Kapitel 4.4.2.).

4.4.2. Verwendete Outcome Measures

Die Bewertung der histologischen Qualität von Knorpel-Reparationsgeweben ist eines der Standardinstrumente der präklinischen Forschung [19, 163]. In dem hier beschriebenen Experiment wurde die Gewebemorphologie (unterstützt durch polarisierte Lichtmikroskopie zur Bewertung der Kollagenfaserarchitektur), und die Zusammensetzung des Gewebes aus Typ I, Typ II und Typ X Kollagen (anhand immunhistochemischer Methoden) bewertet. Eine Bewertung des Glykosaminoglykan Gehaltes war trotz umfassender Bemühungen nicht möglich, was am Ehesten durch die lange Fixations- und Entkalkungszeit begründet ist (siehe Hoemann et al. für detaillierte Empfehlung zur histologischen Aufbereitung verschiedener osteochondraler Proben [19]). Obwohl der Gehalt an spezifischen Kollagenen und die Gewebemorphologie bedeutend für die mechanischen Eigenschaften sind, so sind sie aktuell keine etablierten Surrogatmarker für die mechanische Qualität. Diese kann aktuell nur durch biomechanische Testung (z.B. Indentation) bestimmt werden. Obwohl die biomechanische Testung wertvolle Informationen über die Knorpelqualität liefern kann, wurde in dem aktuellen Experiment darauf verzichtet, um die Integrität der Proben für die histologische Analyse zu gewährleisten.

Gleichermaßen sind biochemische und molekular-biologische Analysen wertvoll in der Identifizierung der in die Heilung involvierten Zelltypen, in der Beschreibung der Dauer der Transgenexpression, sowie der Effekte des

Transgenes auf seine Zielgene (z.B. Kollagen- und Proteoglykanexpression). Jedoch würden auch diese Analysen die Integrität der Proben kompromittieren und wurden daher nicht angewendet um die histologische Analyse zu ermöglichen.

Eine Erhöhung der Tieranzahl für die Durchführung dieser Analysen wäre ohne Beweis der in-vivo Effektivität IHHs kaum begründbar. Nun, nach erfolgreichem „Proof of Concept“, erscheinen detaillierte Studien zur Replikation der hier beschriebenen Ergebnisse, sowie zur Beschreibung der zugrundeliegenden Mechanismen, als gerechtfertigt.

Der hier untersuchte Zeitraum von 13 Wochen ist als Langzeitbewertung von Knorpelreparationsverfahren im Kaninchenmodell anerkannt [19]. Allerdings können zu diesem Zeitpunkt noch keine ausgeprägten strukturellen Schäden im Sinne einer post-traumatischen Arthrose beobachtet werden. Es existieren keine anerkannten Surrogatmarker um das Risiko der Entstehung einer post-traumatischen Arthrose vorherzusagen. Um Schlüsse auf den Effekt der Therapie zur Verhinderung einer post-traumatischen Arthrose zu ziehen, müssen Experimente mit längerem Überwachungszeitraum durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Einleitung

Fokale Gelenkknorpeldefekte treten in der Deutschen Bevölkerung mit einer geschätzten Inzidenz von über 300 000 jährlichen Fällen auf. In der US-amerikanischen Bevölkerung wird jährlich von über 600 000 Fällen ausgegangen. Aufgrund der Insuffizienz körpereigener Heilungskapazitäten und verfügbarer Therapieverfahren, schreitet die Erkrankung regelhaft zur post-traumatischen Arthrose fort. Neben der individuellen Lebensqualitätseinschränkung besteht eine sozioökonomische Bedeutung mit geschätzten Krankheitskosten von jährlich über 10 Milliarden US Dollar in den Vereinigten Staaten.

Das Versagen zellbasierter Therapieverfahren beruht unter anderem auf einer Insuffizienz der chondrogenen Differenzierung, sowie der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten mit nachfolgender Osteogenese analog den Vorgängen in der Wachstumsfuge. Für die Induktion der chondrogenen Differenzierung stehen insbesondere Mitglieder der TGF- β Superfamilie, wie BMP-2, zur Verfügung. Diese sind jedoch ebenso durch eine Induktion der hypertrophen Differenzierung gekennzeichnet. Zur Induktion der Chondrogenese unter Umgehung der TGF- β -Signalwege wurde IHH in-vitro als vielversprechend beschrieben. Bislang besteht jedoch kein Nachweis der in-vivo Effektivität von IHH zur Knorpelreparation.

Die Schaffung eines Wachstumsfaktor-Milieus in der Gelenkknorpelläsion in-vivo stellt ebenso eine Herausforderung dar. Diesbezüglich wurde ein vereinfachtes Verfahren zum lokalisierten in-vivo Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren und autologen Knochenmarkskoagulaten anhand von Markergenen beschrieben. Die Effektivität jenes Verfahrens zur in-vivo Knorpelreparation wurde noch nicht gezeigt.

Zweck dieses kontrollierten in-vivo Experimentes ist es, mittels des oben genannten Gentransferverfahrens die Wirksamkeit von BMP-2 und IHH zur Reparation von osteochondralen Defekten in New Zealand White Rabbits nachzuweisen. Die zentrale Hypothese lautete, dass *BMP2* beziehungsweise *IHH* Gentransfer in einer höheren langzeit-histologischen Qualität des Reparationsgewebes resultiert. Explorativ sollten dabei Unterschiede in den einzelnen Dimensionen der Gewebequalität anhand des ICRS-II Histology Scoring Systems, sowie der Grad der Typ I (als Faserknorpelmarker), Typ II (als Marker hyalinen Gelenkknorpels) und Typ X Kollagen Deposition (als Marker hypertropher Chondrozyten) beschrieben werden.

Material und Methoden

Als Tiermodell wurden bilaterale 3,2 mm durchmessende osteochondrale Bohrlochdefekte in der Trochlea von New Zealand White Rabbits verwendet (n=10 unabhängige Tiere, 20 Gelenke). Die Defekte wurden mit autologen Knochenmarkkoageln gefüllt, die nach vorheriger Beckenkammaspiration gewonnen wurden. In den experimentellen Gruppen wurden die Knochenmarkkoagel beladen mit jeweils 1×10^{11} infektiösen Partikeln adenoviraler Vektoren, die cDNA codierend für *BMP2* (n=3 Tiere, entsprechend 6 Gelenken) oder *IHH* (n=4; 8) enthielten. In der Kontrollgruppe wurde das nicht-chondrogene Markergen *GFP* (n=3; 6) transferiert. Beide Gelenke eines Tieres wurden der gleichen Gruppe zugeordnet. Die histologische Gewebequalität wurde nach 13 Wochen anhand des ICRS-II Scoringsystems durch 3 unabhängige, verblindete Untersucher bewertet. Als primäre Outcomes wurden der ICRS-II Parameter „Generelles Assessment“, sowie die Typ II Kollagen positive Fläche designiert. Als explorative Outcomes wurden die verbleibenden ICRS-II Parameter, sowie die Typ I und Typ X Kollagen Deposition bewertet. Die Korrelation zwischen den Untersuchern wurde nach Pearson ermittelt. Zum Test auf Signifikanz der Gruppenunterschiede wurde

ein lineares gemischtes Modell verwendet, welches einer mögliche Abhängigkeit beider Gelenke eines Tieres Rechnung trägt.

Ergebnisse

Qualitative Bewertung des Reparationsknorpels. Dreizehn Wochen nach der Intervention zeigten die meisten der BMP-2 behandelten Gelenke (4 von 6) und alle der IHH behandelten Gelenke (8 von 8) hyalin-artigen Reparationsknorpel, während alle GFP behandelten Kontrollgelenke (6 von 6) faserknorpel-artiges Reparationsgewebe zeigten. Zwei BMP-2 behandelten Gelenke zeigten eine ausgeprägte intraläsionale Knochenformation.

Primäre Outcomes - ICRS-II „Generelles Assessment“ und Typ II Kollagen positive Fläche. IHH und BMP-2 behandelte Gelenke zeigten im Vergleich zu GFP höhere Punktzahlen in dem ICRS-II „Generelles Assessment“ Parameter: +33.0 (95% Konfidenzintervall: -0.4, +66.4) Punkte für IHH und +8.5 (-26.6, +43.7) Punkte für BMP-2. Beide Effekte erreichten nicht das Level statistischer Signifikanz ($p=0.052$ und 0.537). IHH erhöhte die Typ II Kollagen Deposition in der Defektregion, während BMP-2 Gelenke keinen Unterschied zu GFP Kontrollen zeigten: +18.7 (-4.5, +42.0) Punkte für IHH und +0.0 (-29.7, +29.8) Punkte für BMP-2. Die erhöhte Typ II Kollagendeposition erreichte nicht das konventionelle Level statistischer Signifikanz ($p=0.093$).

Sekundäre Outcomes - ICRS-II Parameter. In dem Vergleich von BMP-2 mit GFP Kontrollen wurde in keinem der 12 untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied festgestellt. IHH Gentransfer resultierte hingegen in höheren Punktzahlen in allen untersuchten Parametern, wobei der Unterschied in 5 der 12 Parameter das Niveau statistischer Signifikanz erreichte. Ein um 21.5 Punkte (+3.6, +39.4) erhöhter Score wurde für den Parameter „Gewebemorphologie“ beobachtet, sowie +21.0 (+6.4, +35.7) für „Chondrozytäres Clustering“, +31.2 (+0.8, +61.5) für „Formation der Tidemark“,

+17.3 (+0.2, +34.5) für „Abnorme Kalzifikation/Ossifikation“ und +35.0 (+4.6, +65.2) für das „Assessment der mittleren und tiefen Zone“.

Sekundäre Outcomes - Marker chondrozytärer Hypertrophie. Eine perizelluläre Deposition von Typ X Kollagen wurde in allen Gruppen beobachtet. Eine deutlich gesteigerte Deposition wurde nur in den Gelenken beobachtet, die nach *BMP2* Gentransfer eine ausgeprägte intraläsionale Knochenformation zeigten.

Diskussion

Das hier beschriebene Experiment stellt die erste Veröffentlichung der Wirksamkeit von IHH zur Verbesserung der histologischen Knorpelqualität von in-vivo therapierten Gelenkknorpeldefekten dar [175]. Die Hypothese, dass IHH zu einer verbesserten histologischen Knorpelqualität führt wurde bestätigt, während die Hypothese zu den positiven Effekten von BMP-2 widerlegt wurde. IHH führte zu besseren Ergebnissen in allen Untersuchten Parametern, das Niveau statistischer Signifikanz wurde dabei in den Parametern „Gewebemorphologie“, „Chondrozytäres Clustering“, „Formation der Tidemark“, „Abnorme Kalzifikation/Ossifikation“ und „Assessment der mittleren und tiefen Zone“ erreicht. Das primäre Ziel dieses Experimentes war es, den „Proof of concept“ zu liefern, dass IHH auch in-vivo ein attraktiver Faktor für die Induktion der Chondrogenese darstellt. Das langfristige Ziel ist die Induktion der Chondrogenese unter Umgehung des TGF- β Signalweges zu erzielen, um eine folgende hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten und die folgende Ossifikation des reparierten Defektes zu verhindern.

Die Limitationen der Studie umfassen die ausschließlich histologische und immunhistochemische durchgeführte Bewertung der Knorpelqualität und eine eingeschränkte statistische Power. Ob IHH es vermag die hypertrophe Differenzierung zu umgehen und somit eine langfristige hyaline Knorpelreparation zu ermöglichen, ist in weiteren präklinischen Studien mit

biochemischer und molekulargenetischer Analyse der Hypertrophie-Marker zu untersuchen. In Bezug auf den klinischen Einsatz zur Knorpelreparation erscheint der Einsatz der Wachstumsfaktoren als Protein auf funktionalisierten Matrices vielversprechend.

BMP-2 wird aufgrund der hier beobachteten intraläsionalen Knochenformation nach *BMP2* Gentransfer als nicht geeignet zur Unterstützung der Knorpelreparation in-vivo bewertet.

6. Literaturverzeichnis

1. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1997;13(4):456–460. doi:10.1016/S0749-8063(97)90124-9.
2. Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand*. 1996;67(2):165–168.
3. Holland C. Kniegelenksarthroskopie - Fehlervermeidungsstrategien. *Rheinisches Ärzteblatt*. 2006;(3).
4. Kim S, Bosque J, Meehan JP, Jamali A, Marder R. Increase in Outpatient Knee Arthroscopy in the United States: A Comparison of National Surveys of Ambulatory Surgery, 1996 and 2006. *J Bone Joint Surg Am*. 2011;93(11):994–1000. doi:10.2106/JBJS.I.01618.
5. Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic Osteoarthritis: A First Estimate of Incidence, Prevalence, and Burden of Disease. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2006;20(10):739–744. doi:10.1097/01.bot.0000246468.80635.ef.
6. OECD. Hip and knee replacement. In: *Health at a Glance 2011*. OECD Publishing; 2011. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2011/hip-and-knee-replacement_health_glance-2011-35-en. Accessed July 3, 2012.
7. Statistisches Bundesamt. Bevölkerung Deutschlands bis 2060 - 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. *Begleitmaterial zur Pressekonferenz am 18 November 2009 in Berlin*. 2009.
8. U. S. Census Bureau. Profile of General Population and Housing

Characteristics: 2010. 2010. Available at:
http://factfinder2.census.gov/faces/tableservices/jsf/pages/productview.xhtml?pid=DEC_10_DP_DPDP1. Accessed July 6, 2012.

9. Schneider U, Rackwitz L, Andereya S, et al. A Prospective Multicenter Study on the Outcome of Type I Collagen Hydrogel-Based Autologous Chondrocyte Implantation (CaReS) for the Repair of Articular Cartilage Defects in the Knee. *Am J Sports Med.* 2011. doi:10.1177/0363546511423369.

10. Yelin E, Murphy L, Cisternas MG, Foreman AJ, Pasta DJ, Helmick CG. Medical care expenditures and earnings losses among persons with arthritis and other rheumatic conditions in 2003, and comparisons with 1997. *Arthritis & Rheumatism.* 2007;56(5):1397–1407. doi:10.1002/art.22565.

11. Benninghoff A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte.* 1925;76:43–63. doi:10.1007/BF02134417.

12. Redler I, Mow VC, Zimny ML, Mansell J. The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1975;(112):357–362.

13. Böttcher P, Zeissler M, Maierl J, Grevel V, Oechtering G. Mapping of split-line pattern and cartilage thickness of selected donor and recipient sites for autologous osteochondral transplantation in the canine stifle joint. *Vet Surg.* 2009;38(6):696–704. doi:10.1111/j.1532-950X.2009.00527.x.

14. Zeissler M, Maierl J, Grevel V, Oechtering G, Böttcher P. Cartilage thickness and split-line pattern at the canine humeral trochlea. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2010;23(5):343–347. doi:10.3415/VCOT-10-02-0021.

15. Schwartz M, Ciccotti M. Structure and Function of cartilage biology. In: Mirzayan R, ed. *Cartilage injury in the athlete.* New York: Thieme; 2006:3–6.

16. McDevitt CA. Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans

and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1973;32(4):364–378.

17. Metz J. Makroskopie, Histologie und Zellbiologie des Gelenkknorpels. In: Erggelet C, Steinwachs M, eds. *Gelenkknorpeldefekte*. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2001.

18. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4(1):30–35.

19. Hoemann C, Kandel R, Roberts S, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) Recommended Guidelines for Histological Endpoints for Cartilage Repair Studies in Animal Models and Clinical Trials. *Cartilage.* 2011;2:153–172. doi:10.1177/1947603510397535.

20. Diab M, Wu JJ, Eyre DR. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem J.* 1996;314 (Pt 1):327–332.

21. Schmid TM, Linsenmayer TF. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol.* 1985;100(2):598–605.

22. Von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* 1992;35(7):806–811.

23. Matthews BF. Composition of Articular Cartilage in Osteoarthritis. *Br Med J.* 1953;2(4837):660–661.

24. Huber M, Trattig S, Lintner F. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol.* 2000;35(10):573–580.

25. Lee T, Fornalski S, Sasaki T, Woo S. Biomechanics of synovial joints. In: Mirzayan R, ed. *Cartilage injury in the athlete*. New York: Thieme; 2006:10–23.

26. Lee DA, Bader DL. Compressive strains at physiological frequencies

influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. *Journal of Orthopaedic Research*. 1997;15(2):181–188. doi:10.1002/jor.1100150205.

27. Minas T, Glowacki J. Cartilage Repair and Regeneration. In: Minas T, ed. *A Primer in Cartilage Repair and Joint Preservation of the Knee*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.

28. Nebelung S, Gavenis K, Lüring C, et al. Simultaneous anabolic and catabolic responses of human chondrocytes seeded in collagen hydrogels to long-term continuous dynamic compression. *Ann Anat*. 2012;194(4):351–358. doi:10.1016/j.aanat.2011.12.008.

29. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):213. doi:10.1186/ar2195.

30. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme; 2009.

31. Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;93(1):93–103. doi:10.1002/jcb.20211.

32. Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2009;11(3):227. doi:10.1186/ar2655.

33. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr Cartil*. 2013;21(1):16–21. doi:10.1016/j.joca.2012.11.012.

34. Lotz MK. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Research & Therapy*. 2010;12(3):211. doi:10.1186/ar3046.

35. Repo RU, Finlay JB. Survival of articular cartilage after controlled impact. *J Bone Joint Surg Am*. 1977;59(8):1068–1076.

36. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am.* 1982;64(3):460–466.
37. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(4):532–553.
38. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Åkerlund EL, Lindahl A. Autologous Chondrocyte Transplantation Biomechanics and Long-Term Durability. *Am J Sports Med.* 2002;30(1):2–12.
39. Panossian VR. Response of Articular Cartilage to Injury. In: Mirzayan R, ed. *Cartilage injury in the athlete.* New York, Stuttgart: Theme; 2006.
40. Minas T. Patient Evaluation, Cartilage Defect, and Evidence: Putting It All Together. In: Minas T, ed. *A Primer in Cartilage Repair and Joint Preservation of the Knee.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
41. Widuchowski W, Widuchowski J, Koczy B, Szyluk K. Untreated Asymptomatic Deep Cartilage Lesions Associated With Anterior Cruciate Ligament Injury Results at 10- and 15-Year Follow-Up. *Am J Sports Med.* 2009;37(4):688–692. doi:10.1177/0363546508328104.
42. Outerbridge R. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br.* 1961;43-B:752–757.
43. Brittberg M, Aglietti P, Gambardella R, et al. ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. 2000.
44. Lysholm J, Hamberg P, Gillquist J. The correlation between osteoarthritis as seen on radiographs and on arthroscopy. *Arthroscopy.* 1987;3(3):161–165.
45. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2006;14(11):1119–1125. doi:10.1016/j.joca.2006.05.003.

46. Rose T, Craatz S, Hepp P, et al. The autologous osteochondral transplantation of the knee: clinical results, radiographic findings and histological aspects. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2005;125(9):628–637. doi:10.1007/s00402-005-0010-8.
47. Paul J, Sagstetter A, Kriner M, Imhoff AB, Spang J, Hinterwimmer S. Donor-Site Morbidity After Osteochondral Autologous Transplantation for Lesions of the Talus. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(7):1683–1688. doi:10.2106/JBJS.H.00429.
48. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*. 2004;13(5):595–600.
49. Bentley G, Biant LC, Carrington RWJ, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85(2):223–230.
50. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee A Randomized Trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86(3):455–464.
51. Saris DBF, Vanlauwe J, Victor J, et al. Characterized Chondrocyte Implantation Results in Better Structural Repair When Treating Symptomatic Cartilage Defects of the Knee in a Randomized Controlled Trial Versus Microfracture. *The American Journal of Sports Medicine*. 2008;36(2):235–246. doi:10.1177/0363546507311095.
52. Hubbard MJ. Articular debridement versus washout for degeneration of the medial femoral condyle. A five-year study. *J Bone Joint Surg Br*. 1996;78(2):217–219.
53. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br*. 1959;(41-B):618, 619.

54. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: Present status. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1986;2(1):54–69. doi:10.1016/S0749-8063(86)80012-3.
55. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technique to treat full thickness articular cartilage defects of the knee. *Der Orthopäde*. 1999;28(1):26–32. doi:10.1007/PL00003545.
56. Behrens P. Matrixgekoppelte Mikrofrakturierung. *Arthroskopie*. 2005;18(3):193–197. doi:10.1007/s00142-005-0316-0.
57. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889–895. doi:10.1056/NEJM199410063311401.
58. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, et al. The use of chondrogide membrane in autologous chondrocyte implantation. *The Knee*. 2004;11(1):51–55. doi:10.1016/S0968-0160(03)00041-3.
59. Cherubino P, Grassi FA, Bulgheroni P, Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2003;11(1):10–15.
60. Dell'Accio F, Bari CD, Luyten FP. Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44(7):1608–1619. doi:10.1002/1529-0131(200107)44:7<1608::AID-ART284>3.0.CO;2-T.
61. Niedermann B, Boe S, Lauritzen J, Rubak JM. Glued periosteal grafts in the knee. *Acta Orthop Scand*. 1985;56(6):457–460.
62. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, Linden A van der. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72-B(6):1003–1007.

63. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy*. 1993;9(3):318–321.
64. Imhoff AB, Burkart A, Öttl GM. The transfer of the posterior femoral condyle – first results of a salvage operation. *Der Orthopäde*. 1999;28:45–51. doi:10.1007/PL00003549.
65. Vasiliadis HS, Wasiak J. Autologous chondrocyte implantation for full thickness articular cartilage defects of the knee. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 1996. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003323.pub3/abstract>. Accessed July 30, 2012.
66. Worthen J, Waterman CPTBR, Davidson PA, Lubowitz JH. Limitations and Sources of Bias in Clinical Knee Cartilage Research. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. (0). doi:10.1016/j.arthro.2012.02.022.
67. Bartlett W. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: A PROSPECTIVE, RANDOMISED STUDY. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*. 2005;87-B(5):640–645. doi:10.1302/0301-620X.87B5.15905.
68. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, et al. A Randomized Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Findings at Five Years. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(10):2105–2112. doi:10.2106/JBJS.G.00003.
69. Saris DBF, Vanlauwe J, Victor J, et al. Treatment of Symptomatic Cartilage Defects of the Knee: Characterized Chondrocyte Implantation Results in Better Clinical Outcome at 36 Months in a Randomized Trial Compared to Microfracture. *Am J Sports Med*. 2009;37(1 suppl):10S–19S. doi:10.1177/0363546509350694.
70. Mithöfer K, Minas T, Peterson L, Yeon H, Micheli LJ. Functional Outcome

of Knee Articular Cartilage Repair in Adolescent Athletes. *Am J Sports Med.* 2005;33(8):1147–1153. doi:10.1177/0363546504274146.

71. Mithöfer K, Peterson L, Mandelbaum BR, Minas T. Articular Cartilage Repair in Soccer Players With Autologous Chondrocyte Transplantation Functional Outcome and Return to Competition. *Am J Sports Med.* 2005;33(11):1639–1646. doi:10.1177/0363546505275647.

72. Von der Mark K, Gauss V, Mark HVD, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. , *Published online: 09 June 1977; | doi:101038/267531a0.* 1977;267(5611):531–532. doi:10.1038/267531a0.

73. Jakob M, Démartheau O, Schäfer D, et al. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2001;81(2):368–377. doi:10.1002/1097-4644(20010501)81:2<368::AID-JCB1051>3.0.CO;2-J.

74. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.* 1999;284(5411):143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143.

75. Pascher A, Palmer G, Steinert A, et al. Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther.* 2004;11(2):133–141.

76. Vieweg J. Grundlagen der Genterapie. *Der Urologe A.* 1996;35(5):378–389. doi:10.1007/s001200050039.

77. Nixon AJ, Goodrich LR, Scimeca MS, et al. Gene therapy in musculoskeletal repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1117:310–327. doi:10.1196/annals.1402.065.

78. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances

cartilage healing in an equine model. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*. 2007;89-B(5):672–685. doi:10.1302/0301-620X.89B5.18343.

79. Wiley Database. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. 2012. Available at: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>. Accessed August 15, 2012.

80. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(5):346–358. doi:10.1038/nrg1066.

81. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther*. 1996;7(10):1261–1280. doi:10.1089/hum.1996.7.10-1261.

82. Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in Gene Therapy for Cartilage Repair. *Injury*. 2008;39(Suppl 1):S97–113. doi:10.1016/j.injury.2008.01.034.

83. Fortier L, Barker J, Strauss E, McCarrel T, Cole B. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2011;469(10):2706–2715. doi:10.1007/s11999-011-1857-3.

84. Wozney JM. Bone Morphogenetic Proteins. *Progress in Growth Factor Research*. 1989;1(4):267–280. doi:10.1016/0955-2235(89)90015-X.

85. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893–899.

86. Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009;20(5–6):481–488. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.003.

87. Kroeze RJ, Knippenberg M, Helder MN. Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;702:233–248. doi:10.1007/978-1-61737-960-4_17.

88. Han D, Sun X, Zhang X, Tang T, Dai K. Ectopic osteogenesis by ex vivo gene therapy using beta tricalcium phosphate as a carrier. *Connect Tissue Res.* 2008;49(5):343–350. doi:10.1080/03008200802325029.
89. Ishikawa H, Kitoh H, Sugiura F, Ishiguro N. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthop.* 2007;78(2):285–292. doi:10.1080/17453670710013816.
90. Kang Q, Song W-X, Luo Q, et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18(4):545–559. doi:10.1089/scd.2008.0130.
91. FDA. Recently-Approved Devices - InFUSE™ Bone Graft/LT-CAGE™ Lumbar Tapered Fusion Device - P000058. 2002. Available at: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm083423.htm>. Accessed August 21, 2012.
92. Abrahamsson CK, Yang F, Park H, et al. Chondrogenesis and mineralization during in vitro culture of human mesenchymal stem cells on three-dimensional woven scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(12):3709–3718. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0190.
93. An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(4):1647–1654. doi:10.1007/s10439-009-9892-x.
94. Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation.* 2001;67(4-5):128–138. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.670405.x.
95. Choi Y-A, Kang S-S, Jin E-J. BMP-2 treatment of C3H10T1/2

mesenchymal cells blocks MMP-9 activity during chondrocyte commitment. *Cell Biol Int*. 2009;33(8):887–892. doi:10.1016/j.cellbi.2009.04.020.

96. Date T, Doiguchi Y, Nobuta M, Shindo H. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro. *J Orthop Sci*. 2004;9(5):503–508. doi:10.1007/s00776-004-0815-2.

97. Dormer NH, Singh M, Wang L, Berkland CJ, Detamore MS. Osteochondral interface tissue engineering using macroscopic gradients of bioactive signals. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(6):2167–2182. doi:10.1007/s10439-010-0028-0.

98. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol*. 2007;211(3):682–691. doi:10.1002/jcp.20977.

99. Henrionnet C, Roeder E, Gillet R, et al. Expression of chondrogenic genes by undifferentiated vs. differentiated human mesenchymal stem cells using array technology. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2010;20(3):175–181. doi:10.3233/BME-2010-0629.

100. Huang AH, Motlekar NA, Stein A, Diamond SL, Shore EM, Mauck RL. High-throughput screening for modulators of mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(11):1909–1921. doi:10.1007/s10439-008-9562-4.

101. Kim H-J, Im G-I. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1543–1551. doi:10.1089/ten.tea.2008.0368.

102. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PIJM, Klein-Nulend J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342(3):902–908.

doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.052.

103. Kurth T, Hedbom E, Shintani N, et al. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(10):1178–1189. doi:10.1016/j.joca.2007.03.015.

104. Lai C-H, Chen S-C, Chiu L-H, et al. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound, Dexamethasone/TGF- β 1 and/or BMP-2 on the Transcriptional Expression of Genes in Human Mesenchymal Stem Cells: Chondrogenic vs. Osteogenic Differentiation. *Ultrasound in Medicine & Biology.* 2010;36(6):1022–1033. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2010.03.014.

105. McCanless JD, Cole JA, Slack SM, Bumgardner JD, Zamora PO, Haggard WO. Modeling Nucleus Pulposus Regeneration In Vitro: Mesenchymal Stem Cells, Alginate Beads, Hypoxia, BMP-2, and Synthetic Peptide B2A. *Spine.* 2011. doi:10.1097/BRS.0b013e31820cd1b1.

106. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, et al. Differential effects of BMP-2 and TGF- β 1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif.* 2007;40(6):809–823. doi:10.1111/j.1365-2184.2007.00473.x.

107. Mohan N, Nair PD, Tabata Y. Growth factor-mediated effects on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D semi-IPN poly(vinyl alcohol)–poly(caprolactone) scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2010;94A(1):146–159. doi:10.1002/jbm.a.32680.

108. Mrugala D, Dossat N, Ringe J, et al. Gene expression profile of multipotent mesenchymal stromal cells: Identification of pathways common to TGF β 3/BMP2-induced chondrogenesis. *Cloning Stem Cells.* 2009;11(1):61–76. doi:10.1089/clo.2008.0070.

109. Nochi H, Sung JH, Lou J, Adkisson HD, Maloney WJ, Hruska KA. Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res.* 2004;19(1):111–122. doi:10.1359/jbmr.2004.19.1.111.

110. Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(3):626–635. doi:10.1002/jbm.a.31254.
111. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, et al. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther*. 2005;12(2):219–228. doi:10.1016/j.ymthe.2005.03.024.
112. Park J, Gelse K, Frank S, von der Mark K, Aigner T, Schneider H. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J Gene Med*. 2006;8(1):112–125. doi:10.1002/jgm.826.
113. Park Y, Sugimoto M, Watrin A, Chiquet M, Hunziker EB. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis Cartil*. 2005;13(6):527–536. doi:10.1016/j.joca.2005.02.006.
114. Ronzière MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria A-M. Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2010;20(3):145–158. doi:10.3233/BME-2010-0626.
115. Rui Y-F, DU L, Wang Y, et al. Bone morphogenetic protein 2 promotes transforming growth factor β 3-induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium-derived stem cells. *Chin Med J*. 2010;123(21):3040–3048.
116. Schmitt B, Ringe J, Häupl T, et al. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation*. 2003;71(9-10):567–577. doi:10.1111/j.1432-0436.2003.07109003.x.
117. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res*. 2005;320(2):269–276.

doi:10.1007/s00441-004-1075-3.

118. Shen B, Wei A, Tao H, Diwan AD, Ma DDF. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(6):1311–1320. doi:10.1089/ten.tea.2008.0132.

119. Shintani N, Hunziker EB. Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):1869–1879. doi:10.1002/art.22701.

120. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(1):84–97. doi:10.1002/jcb.20546.

121. Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Nöth U, Evans CH, Ghivizzani SC. Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(5):1127–1139. doi:10.1089/ten.tea.2007.0252.

122. Steinert AF, Proffen B, Kunz M, et al. Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R148. doi:10.1186/ar2822.

123. Toh WS, Liu H, Heng BC, Rufaihah AJ, Ye CP, Cao T. Combined effects of TGFbeta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors*. 2005;23(4):313–321. doi:10.1080/08977190500252763.

124. Weber M, Steinert A, Jork A, et al. Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterials*. 2002;23(9):2003–2013.

125. Chen J, Chen H, Li P, et al. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials*. 2011;32(21):4793–4805. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.041.
126. Di Cesare PE, R. Frenkel S, Carlson CS, Fang C, Liu C. Regional gene therapy for full-thickness articular cartilage lesions using naked DNA with a collagen matrix. *Journal of Orthopaedic Research*. 2006;24(5):1118–1127. doi:10.1002/jor.20143.
127. Dormer NH, Busaidy K, Berkland CJ, Detamore MS. Osteochondral interface regeneration of rabbit mandibular condyle with bioactive signal gradients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(6):e50–57. doi:10.1016/j.joms.2010.12.049.
128. Dormer NH, Singh M, Zhao L, Mohan N, Berkland CJ, Detamore MS. Osteochondral interface regeneration of the rabbit knee with macroscopic gradients of bioactive signals. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2012;100A(1):162–170. doi:10.1002/jbm.a.33225.
129. Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(3):980–990.
130. Gelse K, Jiang Q-J, Aigner T, et al. Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44(8):1943–1953. doi:10.1002/1529-0131(200108)44:8<1943::AID-ART332>3.0.CO;2-Z.
131. Gelse K, Mühle C, Knaup K, et al. Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1alpha activity. *Osteoarthr Cartil*. 2008;16(12):1457–1465. doi:10.1016/j.joca.2008.04.006.

132. Gelse K, Mühle C, Franke O, et al. Cell-based resurfacing of large cartilage defects: Long-term evaluation of grafts from autologous transgene-activated periosteal cells in a porcine model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(2):475–488. doi:10.1002/art.23124.
133. Gelse K, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor–producing mesenchymal cells. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(2):430–441. doi:10.1002/art.10759.
134. Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest*. 1998;78(2):133–142.
135. Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB, Morris EA. Bone morphogenetic protein 2 stimulates articular cartilage proteoglycan synthesis in vivo but does not counteract interleukin-1 α effects on proteoglycan synthesis and content. *Arthritis & Rheumatism*. 1997;40(6):1020–1028. doi:10.1002/art.1780400605.
136. Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, et al. Optimal Combination of Soluble Factors for Tissue Engineering of Permanent Cartilage from Cultured Human Chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(28):20407 – 20415. doi:10.1074/jbc.M608383200.
137. Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, et al. Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2011;19(8):1066–1075. doi:10.1016/j.joca.2011.05.007.
138. Mimura T, Imai S, Okumura N, et al. Spatiotemporal control of proliferation and differentiation of bone marrow–derived mesenchymal stem cells recruited using collagen hydrogel for repair of articular cartilage defects. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*.

2011;98B(2):360–368. doi:10.1002/jbm.b.31859.

139. Noël D, Gazit D, Bouquet C, et al. Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*. 2004;22(1):74–85. doi:10.1634/stemcells.22-1-74.

140. Palmer GD, Gouze E, Gouze J-N, Betz OB, Evans CH, Ghivizzani SC. Gene transfer to articular chondrocytes with recombinant adenovirus. *Methods Mol Biol*. 2003;215:235–246.

141. Park J, Gelse K, Frank S, von der Mark K, Aigner T, Schneider H. Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *The Journal of Gene Medicine*. 2006;8(1):112–125. doi:10.1002/jgm.826.

142. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) on the Healing of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage*. *JBJS*. 1997;79(10):1452–63.

143. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, et al. Repair of Articular Cartilage Defects: One Year After Treatment with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2)*. *JBJS*. 2000;82(2):151–60.

144. Siebert CH, Schneider U, Sopka S, Wahner T, Miltner O, Niedhart C. Ingrowth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2006;126(4):247–252. doi:10.1007/s00402-005-0061-x.

145. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, et al. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. 2007;100(5):1240–1254. doi:10.1002/jcb.21125.

146. Suzuki T, Bessho K, Fujimura K, Okubo Y, Segami N, Iizuka** T. Regeneration of defects in the articular cartilage in rabbit temporomandibular

joints by bone morphogenetic protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2002;40(3):201–206. doi:10.1054/bjom.2001.0720.

147. Tamai N, Myoui A, Hirao M, et al. A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(5):405–417. doi:10.1016/j.joca.2004.12.014.

148. Tokuhara Y, Wakitani S, Imai Y, et al. Repair of experimentally induced large osteochondral defects in rabbit knee with various concentrations of Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *International Orthopaedics*. 2009;34(5):761–767. doi:10.1007/s00264-009-0818-x.

149. Ueki K, Takazakura D, Marukawa K, et al. The use of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and gelatin sponge complex containing human recombinant bone morphogenetic protein-2 following condylectomy in rabbits. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2003;31(2):107–114. doi:10.1016/S1010-5182(02)00187-7.

150. Van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF- β 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1998;6(5):306–317. doi:10.1053/joca.1998.0129.

151. Van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FAJ, van den Berg WB. Role of nitric oxide in the inhibition of BMP-2-mediated stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2000;8(2):82–86. doi:10.1053/joca.1999.0275.

152. Yang HS, La W-G, Bhang SH, et al. Hyaline cartilage regeneration by combined therapy of microfracture and long-term bone morphogenetic protein-2 delivery. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(13-14):1809–1818.

doi:10.1089/ten.TEA.2010.0540.

153. Anderson GJ, Darshan D. Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nature Chemical Biology*. 2008;4(1):15–16. doi:10.1038/nchembio0108-15.

154. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, et al. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001;128(22):4523–4534.

155. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A. Interaction of Ihh and BMP/Noggin Signaling during Cartilage Differentiation. *Developmental Biology*. 1999;209(2):239–253. doi:10.1006/dbio.1998.9181.

156. NCBI/Entrez. IHH Indian hedgehog [Homo sapiens]-Gene. 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3549>. Accessed August 22, 2012.

157. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423(6937):332–336. doi:10.1038/nature01657.

158. Mak KK, Kronenberg HM, Chuang P-T, Mackem S, Yang Y. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development*. 2008;135(11):1947–1956. doi:10.1242/dev.018044.

159. Steinert AF, Weissenberger M, Kunz M, et al. Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(4):R168. doi:10.1186/ar3921.

160. Mi Z, Ghivizzani SC, Lechman E, Glorioso JC, Evans CH, Robbins PD. Adverse effects of adenovirus-mediated gene transfer of human transforming growth factor beta 1 into rabbit knees. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(3):R132–R139. doi:10.1186/ar745.

161. Steinert AF, Palmer GD, Ghivizzani SC, Evans CH. Gene Therapy in the Treatment of Cartilage Injury. In: Mirzayan R, ed. *Cartilage injury in the athlete*. New York, Stuttgart: Thieme; 2006.

162. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: CSHL Press; 2001.
163. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nestic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II. *The American Journal of Sports Medicine*. 2010;38(5):880–890. doi:10.1177/0363546509359068.
164. Ellis PD. *The Essential Guide to Effect Sizes - Statistical Power, Meta-Analysis, and the Interpretation of Research Results*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.
165. Tscheudschilsuren G, Bosserhoff AK, Schlegel J, et al. Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA. *Experimental Cell Research*. 2006;312(1):63–72. doi:10.1016/j.yexcr.2005.09.017.
166. Gelse K, Klinger P, Koch M, et al. Thrombospondin-1 prevents excessive ossification in cartilage repair tissue induced by osteogenic protein-1. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(15-16):2101–2112. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0691.
167. Long F, Joeng K-S, Xuan S, Efstratiadis A, McMahon AP. Independent regulation of skeletal growth by *Ihh* and IGF signaling. *Dev Biol*. 2006;298(1):327–333. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.042.
168. Hilton MJ, Tu X, Cook J, Hu H, Long F. *Ihh* controls cartilage development by antagonizing *Gli3*, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. *Development*. 2005;132(19):4339–4351. doi:10.1242/dev.02025.
169. Choi K-S, Harfe BD. Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(23):9484–9489. doi:10.1073/pnas.1007566108.
170. Grande DA, Mason J, Light E, Dines D. Stem cells as platforms for

delivery of genes to enhance cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:111–116.

171. Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D, et al. Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther.* 2010;17(6):779–789. doi:10.1038/gt.2010.16.

172. Futagawa Y, Okamoto T, Ohashi T, Eto Y. Efficiency of adenovirus-mediated gene transfer into hepatocytes by liver asanguineous perfusion method. *Research in Experimental Medicine.* 2000;199(5):263–274. doi:10.1007/s004330050124.

173. Weld KJ, Mayher BE, Allay JA, et al. Transrectal gene therapy of the prostate in the canine model. *Cancer Gene Therapy.* 2002;9(2):189–196. doi:10.1038/sj.cgt.7700425.

174. Liu X, Holzwarth JM, Ma PX. Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience.* 2012;12(7):911–919. doi:10.1002/mabi.201100466.

175. Sieker JT, Kunz M, Weißenberger M et al. Direct bone morphogenetic protein 2 and Indian hedgehog gene transfer for articular cartilage repair using bone marrow coagulates. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.008>

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1-1 Zonale Architektur und Zusammensetzung des Gelenkknorpels

Abbildung 1-2 BMP- und IHH Signalweg

Abbildung 1-3 Regulation der Epiphysenfuge durch einen IHH/PTHrP negativen Feedback-Mechanismus

Abbildung 1-4 Lokale Gentransferverfahren zur Heilung von Gelenkknorpelläsionen

Abbildung 2-1 Genterapeutisch-optimierte Knochenmarkkoagel: Schema der chirurgischen Intervention und Defektmorphologie

Abbildung 3-1 Intraläsionale Knochenformation innerhalb der BMP-2 Behandlungsgruppe

Abbildung 3-2 Histologische Qualität des Reparationsknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit BMP-2, IHH oder dem Transfer von nicht-chondrogenen GFP

Abbildung 3-3 Histologische Qualität des Reparationsknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit BMP-2 oder dem Transfer von nicht-chondrogenen GFP

Abbildung 3-4 Histologische Qualität des Reparationsknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit IHH oder dem Transfer von nicht-chondrogenen GFP

Abbildung 3-5 GAG-Färbungen

Abbildung 4-1 Risiko der Osteophytenbildung in in-vivo Studien von BMP-2 zur Gelenkknorpelregeneration

Abbildung 4-2 Risiko der Osteophytenbildung in in-vivo Studien von BMP-2 zur Gelenkknorpelregeneration: Subgruppenanalyse von ex-vivo und in-vivo Gentherapieverfahren

Tabellen

- Tabelle 1-1 Inzidenz fokaler Gelenkknorpelläsionen des Kniegelenkes in Deutschland und den USA: Kalkulation
- Tabelle 1-2 Prävalenz und Kosten der posttraumatischer Gonarthrose den USA: Kalkulation
- Tabelle 1-3 Zusammensetzung des Gelenkknorpels
- Tabelle 1-4 Glykosaminoglykane des Gelenkknorpels
- Tabelle 1-5 „ICRS-Articular cartilage injury classification“
- Tabelle 1-6 Verfahren zur Therapie fokaler Gelenkknorpelläsionen in klinischer Anwendung
- Tabelle 1-7 Faktoren mit Einfluss auf die Indikationsstellung zur Therapie von Knorpelläsionen des Kniegelenkes
- Tabelle 1-8 Kandidaten für gentherapeutisch augmentierte Zell-basierte Therapie von Gelenkknorpelläsionen
- Tabelle 1-9 In klinischen Gentherapie-Studien eingesetzte virale Vektoren
- Tabelle 1-10 Vorteile und Limitationen von gentherapeutisch-optimierten Knochenmarkkoageln als Gentransfersystem zur Therapie von Gelenkknorpelläsionen
- Tabelle 2-1 Hämalauflösung: Zusammensetzung

Tabelle 2-2	0.25% HCl- / 50% Ethanol-Lösung: Zusammensetzung
Tabelle 2-3	1% Eosinlösung: Zusammensetzung
Tabelle 2-4	Immunhistochemische Färbungen: Zielproteine, verwendete Antikörperkonzentrationen und Probenvorbereitung
Tabelle 2-5	0.05 M TBS: Zusammensetzung
Tabelle 2-6	Blockierungslösung: Zusammensetzung
Tabelle 2-7	ICRS II Histological Scoring System [ICRS II]
Tabelle 2-8	Vorgehensweise der Typ II Kollagen Histomorphometrie: erstellt für Adobe Photoshop CS5 Extended für Mac, Version 12.0.4 (Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA)
Tabelle 3-1	Korrelation zwischen den Bewertern
Tabelle 3-2	Histologische Qualität des Reparationsknorpelgewebes 13 Wochen nach der Behandlung mit BMP-2, IHH oder dem Transfer von nicht-chondrogenen GFP
Tabelle 4-1	BMP-2 für in-vivo Knorpelreparation: Systematische MEDLINE Recherche
Tabelle 4-2	Benötigte Versuchstierzahl zum Ausschluss von unerwünschten Wirkungen: Power-Analyse
Tabelle 4-3	IHH für in-vivo Knorpelreparation: Systematische MEDLINE Recherche

Danksagung

Ich danke Manuela Kunz, Viola Zehe, Patrick Prager M.S. und Benedikt Proffen für die Einführung in die Labormethoden. Herrn B. Heuler, Manuela Kunz, Dr. med. Manuel Weißenberger, Dr. med. Söhnke Frey, Dr. med. Lars Rackwitz und Prof. Dr. med. Andre Steinert danke ich für die Durchführung und Unterstützung des Tierexperimentes. Ich danke Peter Forbes, M.A. vom Harvard Clinical and Translational Science Center für seine Unterstützung im Umgang mit gemischten linearen Modellen. Ich danke Manuela Kunz, Dr. med. Fabian Gilbert, und Prof. Dr. med. Andre Steinert für die sorgfältige Bewertung der histologischen Präparate. Ich danke Prof. Dr. med. Maximilian Rudert dafür, mir neben der wissenschaftlichen Ausbildung, auch meine klinische Weiterbildung am König-Ludwig-Haus zu ermöglichen. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Andre Steinert, der seit Beginn dieser Arbeit ein unermüdlicher wissenschaftlicher, sowie klinischer Mentor für mich ist.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, als ein kleines Beispiel für das, was ihre ununterbrochene Unterstützung ermöglichte.

Danksagung

22. März 2015

Jakob Tobias Sieker (geboren am 15 März 1986 in Bad Schwalbach)

Ausbildung

04/2006 – 06/2012	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Studium der Humanmedizin, Note 1,5; Approbation als Arzt
08/1998 – 06/2005	Gymnasium, Pestalozzi-Schule Idstein; Abitur, Note 1,8
08/1996 – 07/1998	Förderstufe, Limeschule Idstein
08/1992 – 07/1996	Grundschule, Taubenbergschule Idstein